



TITLE:

大腸菌と高等植物におけるプロト ポルフィリノーゲンオキシダーゼ の解析(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

成田, 新一郎

CITATION:

成田, 新一郎. 大腸菌と高等植物におけるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの解析. 京都大学, 1999, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1999-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3149394>

RIGHT:

学位申請論文

大腸菌と高等植物におけるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの解析

成田 新一郎

要旨

5-アミノレブリン酸からはじまるポルフィリン生合成経路は微生物、植物、動物に共通して存在し、プロトポルフィリン IX を合成する。プロトポルフィリン IX はヘム合成とクロロフィル合成の分岐点に位置する中間体であると同時に、可視光によって励起され活性酸素種を発生する光増感物質として知られ、生物にとって有用であるとともに危険な物質でもある。

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼはプロトポルフィリノーゲン IX から 6 個の電子を奪ってプロトポルフィリン IX を合成する酵素である。ヒトではこの酵素の欠損は光過敏症を引き起こす遺伝病の原因となる。一方、植物ではこの酵素は光要求性除草剤の標的分子であり、薬学、農学的に重要視されている。申請者は、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性が細胞内でどのように制御されているかを解明する目的で、大腸菌変異株を用いてプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性に関与する遺伝子を解析した。

大腸菌においてプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは *hemG* 遺伝子によってコードされる。本研究では *hemG* 遺伝子に依存せずに増殖できる大腸菌変異株を分離することによって、プロトポルフィリノーゲン IX をプロトポルフィリン IX に変換する別個の経路を探索した。その結果、ヘム合成酵素の一つである酸素依存型コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼがプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を示し得ることを見出した。

次に、大腸菌の *hemG* 変異が他の生物種のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼによって相補されることを利用して、シロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする cDNA を単離した。植物細胞内での発現パターンの解析等の結果、この酵素が葉緑体に局在することが示唆された。

最後に、大腸菌においてプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードすると考えられていた *hemK* 遺伝子について、*hemK* 遺伝子欠失変異株を作製し遺伝学的解析を行うことによって機能の解明を試みた。その結果、*hemK* 遺伝子は *hemA-prfA-hemK* オペロンのプロモーター活性に影響を及ぼすことによってヘム合成とタンパク質合成の双方の活性を間接的に調節し得ることが明らかになった。

本論文ではプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼに関する一連の研究成果を以上の 3 部に分けて報告する。

目次

第1章 序論.....	1
第2章 材料と方法.....	9
第3章 実験結果	
第1節 酸素依存型コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼの プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性.....	21
第2節 シロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを コードする cDNA の解析.....	35
第3節 大腸菌 <i>hemK</i> 遺伝子の機能.....	54
第4章 考察	
第1節 酸素依存型コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼの プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性.....	69
第2節 シロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを コードする cDNA の解析.....	74
第3節 大腸菌 <i>hemK</i> 遺伝子の機能.....	79
謝辞.....	84
参考文献.....	85

この論文の中で用いた省略語を以下に示す。

5-aminolevulinic acid ALA

base pair(s) bp

Celsius °C

complementary DNA cDNA

deoxyribonucleic acid DNA

gram g

hour h

kilobase pairs kb

kilodalton kD

messenger RNA mRNA

N-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine MNNG

microliter µl

micromole µmol

milligram mg

mililiter ml

molar (mole / liter) M

mole mol

nanometer nm

open reading frame ORF

optical density OD

picomole pmol

plaque forming unit(s) pfu

polymerase chain reaction PCR

polypeptide chain release factor 1 RF-1

polypeptide chain release factor 2 RF-2

ribonucleic acid RNA

sodium dodecyl sulfate SDS

transfer RNA tRNA

アミノ酸の略号

alanine A

arginine R

asparagine N

aspartic acid D

cysteine C

glutamine Q

glutamic acid E

glycine G

histidine H

isoleucine I

leucine L

lysine K

methionine M

phenylalanine F

proline P

serine S

threonine T

tryptophan W

tyrosine Y

valine V

この論文の中に示したシロイヌナズナプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする cDNA の塩基配列に関するデータは、DDBJ、EMBL、GenBank 塩基配列データベースに登録済みであり、次の accession number で得ることが可能である；D83139。

第1章 序論

ヘムはチトクロム、カタラーゼ、ヘモグロビンなどのヘムタンパク質の補因子として呼吸やエネルギー代謝、酸素ストレスに対する防御に不可欠な分子であり、5-アミノレブリン酸 (ALA) から始まるヘム合成経路は微生物、植物、動物に共通して存在する (Jordan, 1990; O'Neil and Söll, 1990)。ALA の合成経路は2通り存在し、大腸菌を含む細菌や植物の多くはグルタミン酸から始まる C5 経路を用いるのに対し、動物や光合成細菌ではグリシンとスクシニル CoA から ALA 合成酵素の働きで ALA が合成される (C4 経路) (Jordan, 1990)。2分子の ALA は重合してポルフォビリノーゲンとなり、さらにこれが4分子重合することによりテトラピロール (ポルフィリン) を形成する。ヘム合成経路において最初に合成されるテトラピロールはヒドロキシメチルビレンで、その後側鎖の修飾、酸化など5段階の酵素反応を経て最後の非ヘムポルフィリンであるプロトポルフィリン IX に変換される (図 1-1)。プロトポルフィリン IX はフェロケラターゼによってプロトヘムに変換される一方で、植物においてはマグネシウムケラターゼによってプロトクロロフィリドにも変換される。プロトクロロフィリドからはバクテリオクロロフィル、クロロフィル a、クロロフィル b などが合成される。

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは、プロトポルフィリン生合成の最後の段階でプロトポルフィリノーゲン IX から6個の電子を奪ってプロトポルフィリン IX を合成する酵素である (図 1-2)。この反応を触媒するプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは、その反応機構から大きく2つに分類される。真核生物及び好気性細菌のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは酸素依存型であり、プロトポルフィリノーゲン IX の酸化を行う際の電子受容体として分子状酸素を要求する。一方、大腸菌を含め、嫌気的条件下で生育可能な細菌では、この酵素は酸素非依存型であり、電子を呼吸鎖の電子伝達系に渡すことによってプロトポルフィリノーゲン IX の酸化を行う (Dailey, 1990)。酸素依存型のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは、枯草菌 (Hansson *et al.*, 1997)、粘性細菌

(Dailey, H. A. and T. A. Dailey, 1996)、酵母 (Poulson, 1976; Labbe and Labbe-Bois, 1990; Camadro *et al.*, 1994)、オオムギ (Jacobs and Jacobs, 1987)、ウシ (Siepker *et al.*, 1987)、ラット (Poulson, 1976)、マウス (Proulx and Dailey, 1992)、ヒト (Dailey, T. A. and H. A. Dailey, 1996) において単離、精製されており、酵母ミトコンドリア内膜から精製された酵素が 55 kD の分子量であることが報告されている。酸素非依存型のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼとしては、嫌気性細菌 *Desulfovibrio gigas* から精製されたものが唯一の例であり、この酵素は酸素依存型のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼとは異なり、12 kDa、18 kDa、57 kDa の3つのサブユニットから構成されていることがわかっている (Klemm and Barton, 1987)。

プロトポルフィリノーゲン IX からプロトポルフィリン IX への変換は、*in vitro* では酵素による触媒を必要とせず起こるのに対し、*in vivo* ではプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの酵素活性が必要である。これは、細胞内が還元的条件であり、プロトポルフィリノーゲン IX の自動酸化が起こらないためであると考えられる。また、プロトポルフィリン IX は光増感剤として知られており (Ito and Ito, 1988)、可視光により励起され一重項酸素などの活性酸素種を発生する。このため、細胞内のプロトポルフィリン IX の蓄積は抑えられる必要があり、特に酸化的な環境では、プロトポルフィリノーゲン IX をプロトポルフィリン IX に酸化する活性は、極力抑制されていると考えられる。申請者は、好氣的条件下でプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を示し得る酵素を探すことによって、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性に関する制御機構を解明しようとした。第 1 節では、大腸菌 *hemG* 遺伝子の欠失変異株から復帰変異株を分離、解析することによって、HemG 以外でプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を示し得る酵素を探索した。

植物においては、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼはヘム合成とクロロフィル合成という、2つの合成経路の分岐点の直前に位置するために調節的な役割を持つと考えられるのに加え、ヘム合成中間産物の細胞内輸送機構を解明する上でも最も興味深い酵素の一つである。植物細胞内では、ヘム合成経路は葉緑体とミトコンドリアに存在し、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ以降の反応が葉緑体とミトコンドリアの双方で起こることがわかっている (Porra and Lascelles, 1968; Little and Jones, 1976; Jacobs *et al.*, 1982)。葉緑体がヘム合成に関わる全ての酵素を持っているのに対し (Fuesler *et al.*, 1984; Bhaya and Castelfranco, 1985)、ミトコンドリアではプロトポルフィリノーゲン IX の合成にいたるまでの反応を触媒する酵素活性は検出されていない。このことから、植物細胞内では一部のプロトポルフィリノーゲン IX が葉緑体からミトコンドリアに輸送されることが予想され、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼはヘム合成中間産物の輸送調節という面でも注目される酵素である。

さらに、薬学、農学分野において、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼはジフェニルエーテル系除草剤の標的分子として重要視されてきた。これらの除草剤は *in vitro* で酵母、哺乳類、植物の葉緑体及びミトコンドリアから分離したプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの活性を極めて有効に阻害する (Matringe *et al.*, 1989; Witkowski and Halling, 1989)。植物細胞においてプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの活性が阻害されると、蓄積したプロトポルフィリノーゲン IX が葉緑体やミトコンドリアから流出し、酵素の触媒作用によらない酸化を受けてプロトポルフィリン IX に変換される。ジフェニルエーテル系の化学物質は光要求性除草剤として使用されるが、その作用はプロトポルフィリン IX の光増感作用によるものであり、その結果生じた活性酸素種が植物細胞の膜脂質等に対し酸化的なダメージを与えることによると考えられている。

植物におけるジフェニルエーテル系除草剤の作用機構に類似したものとして、ヒトのポルフィリン症が挙げられる。ポルフィリン症の一種（*variegate porphyria*）はプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする遺伝子が欠損して生じる遺伝病であり、酵素活性の欠失または低下によって細胞内に蓄積したプロトポルフィリン IX が原因となり、光が当たるとその部分の皮膚が損傷を受けるといった症状を引き起こす（Nordman and Deybach, 1990）。また、プロトポルフィリン IX の蓄積による光感受性については大腸菌においても研究されている。フェロケラターゼをコードする *hemH* 遺伝子の変異株は細胞内にプロトポルフィリン IX を蓄積するため、可視光の下に置くと死に到る（Miyamoto *et al.*, 1991; Nakahigashi *et al.*, 1991; Frustaci and O'Brian, 1993）。しかしプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを欠損する大腸菌株は光感受性を示さない。これは、大腸菌細胞内ではプロトポルフィリノーゲン IX からプロトポルフィリン IX への変換が酵素の触媒なしでは起こらないためと考えられる。

このようにプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは医学的にも産業的にも重要な酵素であるにも関わらず、遺伝子に関する研究はヒトの遺伝病に関するものに集中していた。特に植物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする遺伝子は、植物のヘム合成酵素をコードする遺伝子として唯一同定されていない遺伝子であった。第2節では、大腸菌 *hemG* 遺伝子変異株を相補する cDNA クローンを選択することによって、シロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする cDNA の単離を行った。本論文では、単離した cDNA クローンの解析に加え、その後に報告された植物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列との比較を通して、植物細胞内での酵素の局在に関して考察する。

第3節では、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードすると考えられていた *hemK* 遺伝子の機能について、大腸菌 *hemK* 遺伝子変異株を解析することによって解明した。*hemK* 遺伝子は大腸菌染色体上約 27 分に存在し、*hemA-prfA-hemK* オペロンを形成する。*hemA* 遺伝子は C5 ルートからのヘム合成経路（図 1-1）の初期段階に関わるグルタミル tRNA 還元酵素をコードし（Jordan, 1990）、*prfA* 遺伝子は UAG 及び UAA の終始コドン認識してタンパク質合成の終結を行うペプチド鎖解離因子 1（RF-1）をコードする（Weiss *et al.*, 1984）。オペロンを構成する第3の遺伝子、*hemK* は、はじめは大腸菌においてヘム合成の後半、すなわち ALA からプロトポルフィリン IX にいたる経路に関わる構造遺伝子として同定された（Nakayashiki *et al.*, 1995a）。*hemH* 遺伝子変異株は細胞内にプロトポルフィリン IX を蓄積するために光感受性を示すが、さらに *hemK* 遺伝子に変異が起きることによって光感受性はサプレスされる。このため、*hemK* 遺伝子はヘム合成に関わることが予想されるが、実際に関与する反応段階や作用機構はわかっていない。

hemK 遺伝子のホモログは、ゲノムプロジェクトなどの結果、多くの細菌種に存在することが明らかになった。サルモネラ菌（*Salmonella typhimurium* ; Elliott, 1989）、ヘモフィ

ルス菌 (*Haemophilus influenzae*; Fleischmann *et al.*, 1995)、*Helicobacter pylori* (Tomb *et al.*, 1997)、*Neisseria gonorrhoeae* (Gu and Genco, 1997)、*Chlamydia trachomatis* (Stephens *et al.*, 1998)、*Borrelia burgdorferi* (Fraser *et al.*, 1997)、*Treponema pallidum* (Fraser *et al.*, 1998)、*Mycobacterium leprae* (Robison, 1994)、*Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998)、*Mycoplasma pneumoniae* (Himmelreich *et al.*, 1996)、*Mycoplasma genitalium* (Fraser *et al.*, 1995)、*Bacillus subtilis* (Presecan *et al.*, 1997)、*Aquifex aeolicus* (Deckert *et al.*, 1998)、*Synechocystis* sp. (Kaneko *et al.*, 1996) における HemK ホモログは大腸菌 *hemK* 遺伝子から推定されるアミノ酸配列と 30 %以上の相同性がある (図 1-3)。*hemK* 遺伝子の近傍にある遺伝子を調べると、図 1-4 に示したように、*hemK* 遺伝子は多くの細菌種において *prfA* 遺伝子の 3'側 に存在する。これに対し、*hemA* 遺伝子が *hemK* 遺伝子の近傍に存在する例は大腸菌とサルモネラ菌で報告されているのみである。また、*hemK* 遺伝子のホモログはヘム合成経路を持たない細菌種にも存在する。例えば、ヘモフィルス菌はプロトボルフィリン IX までの合成酵素を持たないことが知られているが (Dragomirescu, 1971)、大腸菌 *hemK* 遺伝子と 60 %の相同性を示す遺伝子が存在する。そのほか、古細菌 *Archaeoglobus fulgidus* においても大腸菌 *hemK* 遺伝子と相同性を示す遺伝子が存在する (Klenk *et al.*, 1997)。

これらのデータを総合すると、*hemK* 遺伝子はヘム合成よりもむしろタンパク質合成、特に RF-1 を介した翻訳終結に深く関与していることが予想される。しかし、多くの細菌種で保存されているにも関わらず、*hemK* 遺伝子の機能についての研究は大腸菌

(Nakayashiki *et al.*, 1995) で行われたのみであり、*hemK* 遺伝子産物の実際の役割はわかっていない。大腸菌における *hemK* 遺伝子の機能を解明するために、申請者はまず *hemK* 遺伝子欠失変異株を作製し、解析した。その後、*hemK* 遺伝子を欠失するにも関わらず増殖が回復した変異株を分離し、遺伝学的な解析を行った。その結果、*hemK* 遺伝子欠失変異が *hemA-prfA-hemK* 遺伝子のプロモーター活性に影響を及ぼすことを発見した。

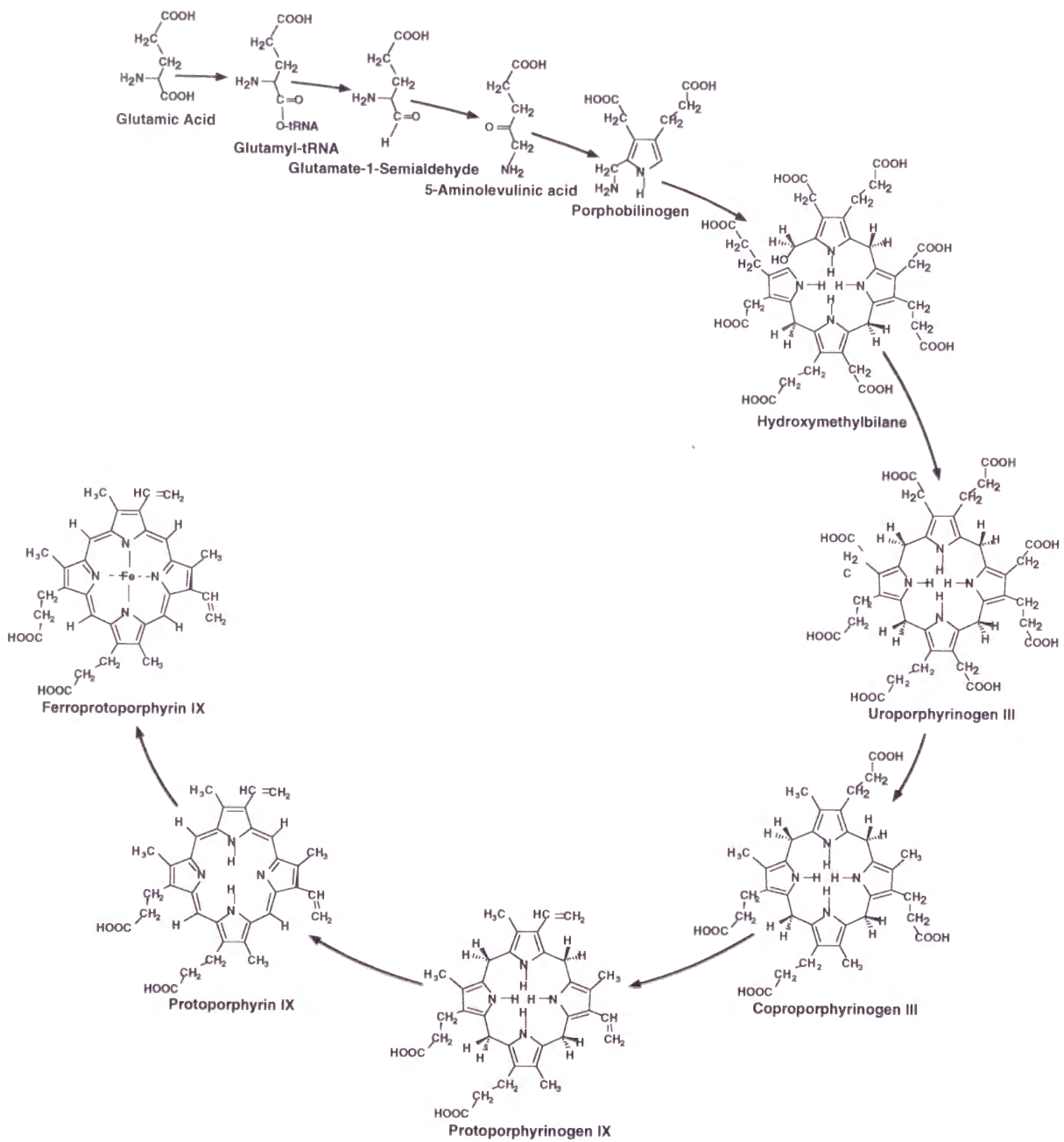


図 1-1 大腸菌におけるヘム合成経路

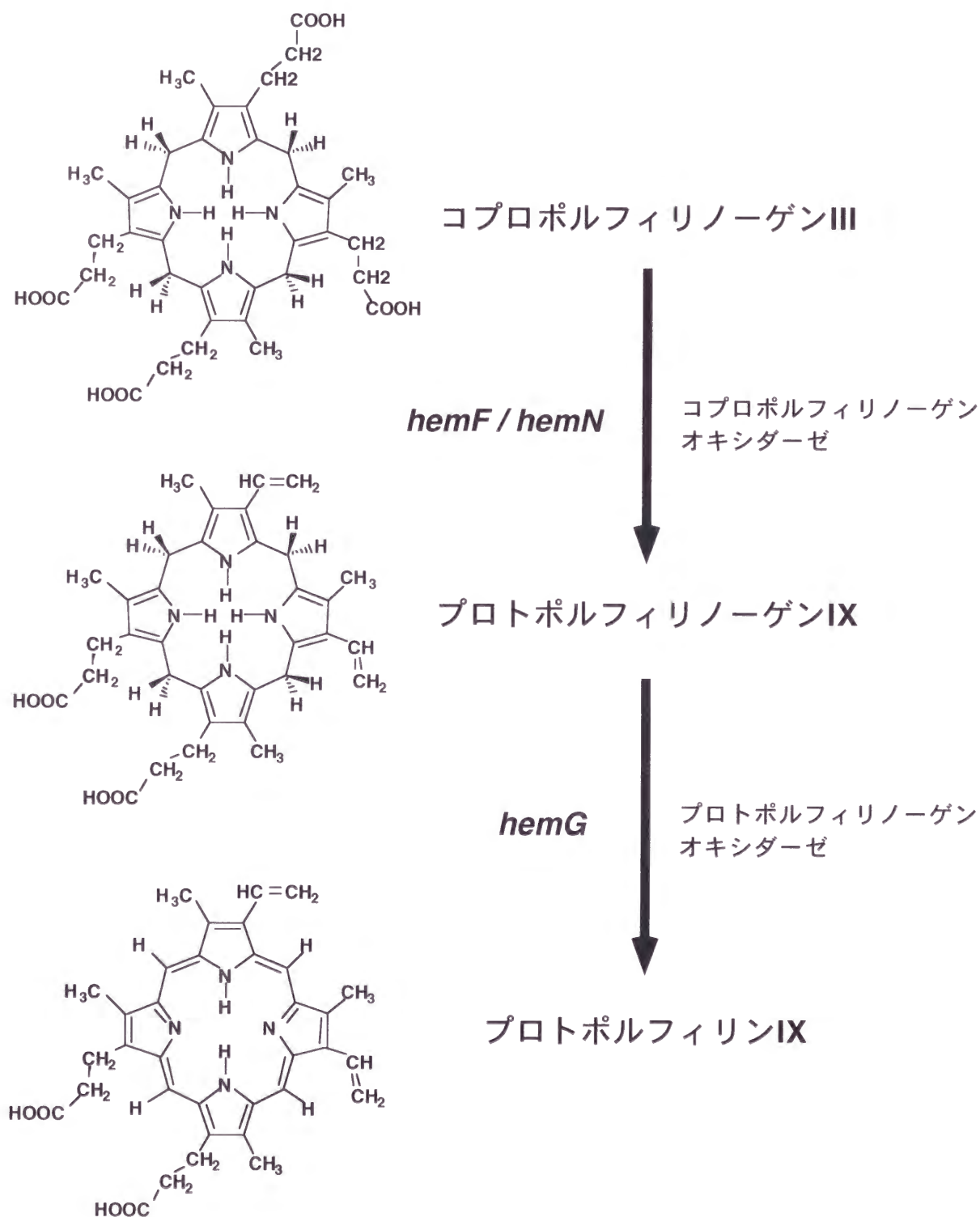


図 1-2 コプロポルフィリノーゲンⅢ からプロトポルフィリンⅨ への変換

各反応を触媒する酵素を矢印の右に、酵素をコードする遺伝子を左に記した。

<i>E. coli</i>	-----MEYQHWLREAISQLQAS --ESPRDAEI
<i>H. influenzae</i>	-----MNYKEWLAQAIADLAKKNPTENSKIDALV
<i>C. trachomatis</i>	-----MKKLLREASEYLLSRG-IRFPQREAED
<i>B. burgdorferi</i>	-----MNINEVINYAKGXNLDT- - - - -IEALL
<i>M. tuberculosis</i>	MTSAPATMRWGNLPLAGESGTMTLRQAI DLAAALLAEAG-VDSARCDAEQ
<i>B. subtilis</i>	-----MKTIFEALKWASSYLTEAG--REENAAEL
	. * *
<i>E. coli</i>	LLEHVTGRG-RTFILAFGETQLTDEQCQQLDALLTRRRDGEPIAHLTGVR
<i>H. influenzae</i>	LLQHATGKS-RTQILAFDDTEIDEKVRLKLTALLDRRLKGPIAYILGEK
<i>C. trachomatis</i>	ILMDLLEISSRS---ALHQAKLSSEEQSLYWKRLRKRGRDRCPTAYIHGKV
<i>B. burgdorferi</i>	ILELILKTK-KELIIANIKKSLTKKEKKLFFDQIDKIEKGPIPIHYILQKK
<i>M. tuberculosis</i>	LAAHLAGTD-RGR-LPLFEPPGD-EFFGRYRDIVTARARRVPLQHLIGTV
<i>B. subtilis</i>	LLLYDTGME-RSKLLASLQEPIGEDELRYFRKRVEMHKEGVFPVQYIIGKE
	. * *
<i>E. coli</i>	EFWSLPLFVSPATLIPRPDTECLVEQALARLPEQP-----CRILDIGTG
<i>H. influenzae</i>	EFWSLPLNVSKGTLPDTEILVEKALQIALEKLEENPPHFRILDIGTG
<i>C. trachomatis</i>	HFLGVELQVTPQVLI PRQETEIFVEQIIIGYLQMHKEK---TTFYDVCCG
<i>B. burgdorferi</i>	EFMGIEFSLNKHVLI PRFDTECLAEALIQIQNG----FKKILDLCGG
<i>M. tuberculosis</i>	SFGPVVLHVGPVFPVPRPETEAILAWATAQSLPAR-----PLIVDACTG
<i>B. subtilis</i>	FFYGREFMVNDVLI PRPETEEVVFHLLKRYSVFSEDGK-LEVVDVGTG
	* . * . *
<i>E. coli</i>	TGAIALALASERP-----DCEIIA VDRMPDAVSLAQRNAQ--HLAIK
<i>H. influenzae</i>	TGAIALALASELAPICQKRHIPLIIGVDLMSDVVALAQSNAE--RNQLN
<i>C. trachomatis</i>	SGCIGLAVRKHCP-----HVRVTLSDISPEALAIASNAR--SNALA
<i>B. burgdorferi</i>	SGCIGLSIAYYIR-----KKVILSDISTKALQIVEKNTKKLKLEKF
<i>M. tuberculosis</i>	SGALAVALAQHRLANLG---LKARIIGIDSDCALDYARRNAAGTPVELV
<i>B. subtilis</i>	SGAIAVTLALENQ -----SFSVSAVDISKEALQVASANAE--KLGAN
	. * * . *
<i>E. coli</i>	NIHILQSDWFSALAGQ--QFAMIVSNPPYIDEQDPHLQQGDVRF-EPLTA
<i>H. influenzae</i>	-VEFLQSRWFDNITG- KFDLIVSNPPYIDAQDEHLHQGDVRF- EPLSA
<i>C. trachomatis</i>	-VDFLLGDLFDPFSPF---ADVLVCNPPYLSYKEFFESDEVRCHPEWKA
<i>B. burgdorferi</i>	-VEIIHSNLLKCIKG---KLDIIITNPPYLN-KEELEIKNKIKK-EPTKA
<i>M. tuberculosis</i>	RADVTTPRLLPELDG---QVDLMVSNPPYIP--DAAVLEPEVAQHDPHHA
<i>B. subtilis</i>	-VRFYQGDLLPEPIKAGKKADIIVSNPPYISEEEMADLSEIVRFHEPLHA
 * . . . * *
<i>E. coli</i>	LVAAD-SGMADIVHII EQSRNALVSGGFLLLEHGWQQGEAVR-QAFILAG
<i>H. influenzae</i>	LVAND-EGYADLRHII ELASSYLSNGVLLLEHGWQQGEKVR-SIFQENH
<i>C. trachomatis</i>	LVGGV-SGIEFYHRIATHIHKILVSGGVGWLEIGSTQGEDIK-QIFHAKG
<i>B. burgdorferi</i>	LLGFGKDGLNISRKILNQAKEKLSPNGLIIIESAPWQIKSLK-DFAIKKG
<i>M. tuberculosis</i>	LFGGP-DGMTVISAVVGLAGRWL RPGGLFAVEHDDTSSSTVDLVSSSTKL
<i>B. subtilis</i>	LTDDG-DGLKFYKRFMEDIPVMKDKVFVFEIGWKQGAAVKDLILKAFK
	* * *
<i>E. coli</i>	YHDVETCRDYGDNERTVTLGRYYQ-----
<i>H. influenzae</i>	WEMVETVRDYSDNERTVTLGFWKK-----
<i>C. trachomatis</i>	IRG-RVLKDYAQLDRFFFL ENQANDAVSS--GEVSGFSEK-----
<i>B. burgdorferi</i>	FSLKTIYDLEKRARALILGQRDDTSIRNCTFNQDK-----
<i>M. tuberculosis</i>	FVDVQARKDLAGRPRFVTAMRWGHLPLAGENGAI DPRQRRCRKR
<i>B. subtilis</i>	GAEVEVLKDKINGKDRITCALIHKNK-----
	* *

図 1-3 HemK ホモログのアミノ酸配列の比較

6 種間において同一である残基の下に * を、性質が類似している残基の下に . を付した。GenBank accession number は以下の通り。*E. coli*, D90756; *H. influenzae*, U32830; *C. trachomatis*, AE001273; *B. burgdorferi*, AE000783; *M. tuberculosis*, Z73419; *B. subtilis*, Z49782。

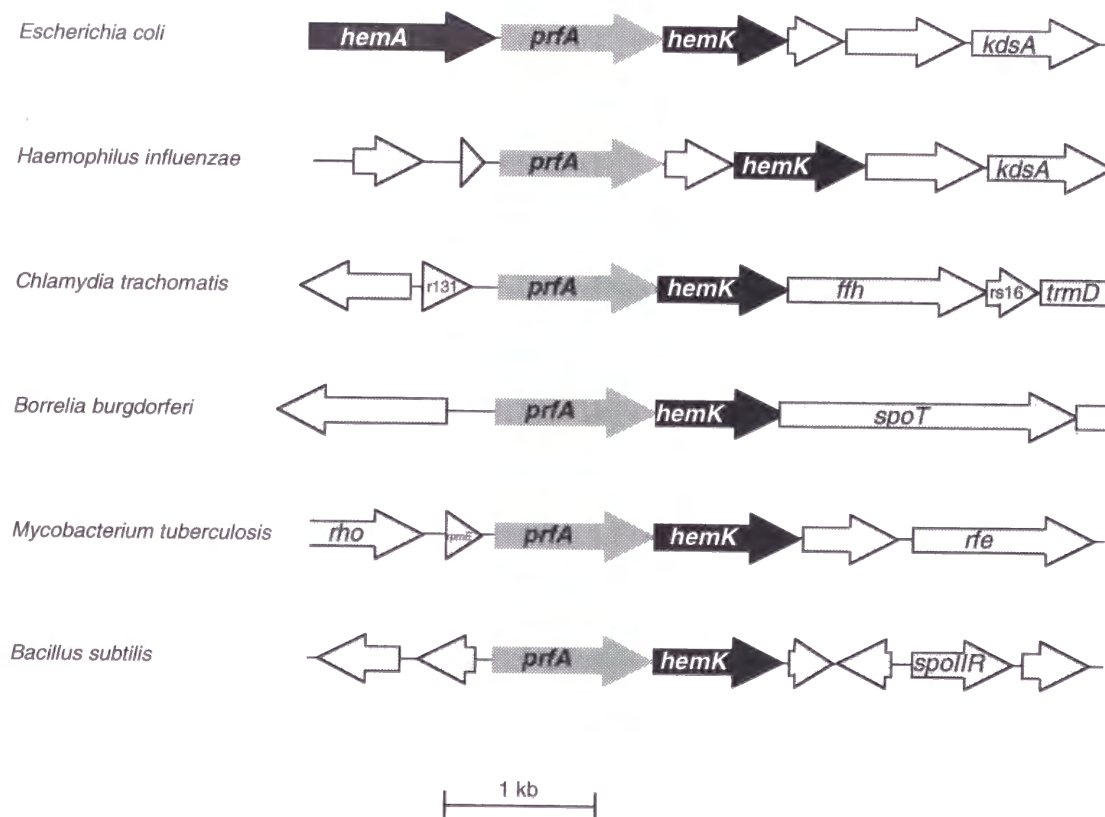


図 1-4 *hemK* 遺伝子付近の遺伝子構成の比較

機能未知の ORF については遺伝子名を省略した。

第2章 材料と方法

2-1. 大腸菌株

本研究で使用した大腸菌株は全て *Escherichia coli* K-12 株由来である。表 2-1 にまとめた。 λ ファージの取り扱いには LE392 (*supE44*, *supF58*, *hsdR514*, *galK2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*, *lacY1*)、プラスミドの調整などには DH5 α (ϕ 80*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argR*)U169, *endA1*, *recA1*, *hsdR17*, *deoR*, *thi-1*, *supE44*, *gyrA96*, *relA1*) を用いた (Sambrook *et al.*, 1989)。

2-2. プラスミドクローンおよびファージクローン

本研究で使用したプラスミドクローンおよびファージクローンを表 2-2 に示す。大腸菌ゲノム上の特定領域の DNA 断片を分離する際に使用したファージクローンは小原らの整列ライブラリー (Kohara *et al.*, 1987) に由来し、3 桁の数字の前に#をつけて記した。

2-3. 培養条件

通常の大腸菌の培養には、LB 培地と λ 培地を、ファージの液体培地での調整には NZM 培地を使用した (Sambrook *et al.*, 1989)。各培地の組成を表 2-3 に示す。プラスミドの単離には Terrific 培地 (Difco, Detroit, USA) を用いた。クロスストリークによる相補性のテストは λ プレート上で行った。大腸菌の培養は原則として 37℃で行い、シロイヌナズナ cDNA による相補実験は 32℃で行った。また λ ファージのヒートインダクションは 45℃で 20 分間行った。嫌気的条件下での培養は Cotter らの方法 (Cotter and Gunsalus, 1989) に従い、Gaspak Anaerobic Systems (BBL, Cockeysville, USA) を用いて培養した。抗生物質は必要に応じて以下の濃度で加えた：アンピシリン、50 μ g / ml；カナマイシン、25 μ g / ml；クロラムフェニコール、20 μ g / ml。また、5-アミノレブリン酸 (ALA) は滅菌水に溶解後 10 μ g / ml で、ヘム酸化物 (ヘミン) は 0.4N アンモニア水に溶解後 10 μ g / ml で LB 培地に加えた。プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの阻害剤アシフルオルフェン (Matringe *et al.*, 1989) は第 3 章の図中に示した濃度で LB 培地に加えた。

2-4. 大腸菌の増殖の測定

大腸菌の一夜培養液を、予め温めた LB 液体培地に OD600 = 0.01 になるように (約 10^3 倍) 希釈し、37℃で培養を続けた。2 時間ごとに 100 μ l を取り出し、島津製作所 (京都) の紫外可視分光光度計 UV-160A で 600 nm の吸光度を測定し、菌数を推定した。

表 2-1 本研究で使した大腸菌株

菌株	関連した遺伝子型	由来または文献
W3110	<i>Escherichia coli</i> K-12 野生株	
DH5α	φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA1 recA1</i> <i>hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
JC7623	<i>recB21 recC22 sbcE44 sbcC201</i>	Kushner <i>et al.</i> , 1971
LE392	<i>supE44 supF58 hsdR514 galK2 galT22 metB1 trpR55</i> <i>lacY1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
CA274	HfrC <i>lacZ</i> _{am125} <i>trp</i> _{am}	Russell <i>et al.</i> , 1970
CA293	HfrC <i>lacZ</i> _{oc659} <i>trp</i> _{am}	Altman <i>et al.</i> , 1971
LS653	F' <i>lacZ</i> _{UGA659} <i>leu</i> _{UGA} <i>trpA</i> _{am9605} <i>his</i> _{am2} <i>ilv</i> ⁻ <i>thyA</i> ⁻ <i>metB</i> ⁻ <i>argH</i> ^{rif} <i>strA</i> ^r (<i>rpSL</i>)	Soll and Berg, 1974
VS200	CA274Δ <i>hemH</i>	Nakahigashi <i>et al.</i> , 1991
VSR800	VS200 <i>hemG</i> ⁻ (λ <i>hemH</i>)	Nishimura <i>et al.</i> , 1995a
VS2003	VS200 (λ <i>hemH</i>)	本研究
JG285	JC7623Δ <i>hemG</i> ::Km ^r	本研究
LG285	LE392Δ <i>hemG</i> ::Km ^r	本研究
JF375	JC7623Δ <i>hemF</i> ::Km ^r	本研究
LF375	LE392Δ <i>hemF</i> ::Km ^r	本研究
N11	LG285 からの復帰変異株	本研究
N13	LG285 からの復帰変異株	本研究
N17	LG285 からの復帰変異株	本研究
NF11	N11Δ <i>hemF</i> ::Cm ^r	本研究
NF13	N13Δ <i>hemF</i> ::Km ^r	本研究
NF17	N17Δ <i>hemF</i> ::Km ^r	本研究
JK783	JC7623Δ <i>hemK</i> ::Cm ^r	本研究
LK783	LE392Δ <i>hemK</i> ::Cm ^r	本研究
CK783	CA293Δ <i>hemK</i> ::Cm ^r	本研究
LLR201	LK783 からの復帰変異株	本研究
HLR201	LK783 からの復帰変異株	本研究

Km^r、カナマイシン耐性；Cm^r、クロラムフェニコール耐性

表 2-2 本研究で使したプラスミドクローンおよびファージクローン

クローン	関連した特徴	由来または文献
プラスミド		
pUC19	高コピーベクター、Amp ^r	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
pUC118	高コピーベクター、Amp ^r	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Bluescript(KS ⁺)	高コピーベクター、Amp ^r	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
pHSG399	高コピーベクター、Cm ^r	Takeshita <i>et al.</i> , 1987
pMW118	低コピーベクター、Amp ^r	ニッポンジーン
pUC4-KAPA	クローニングベクター、Amp ^r Km ^r	Amersham Pharmacia
pMC1871	<i>LacZ</i> 融合遺伝子作製用ベクター	Amersham Pharmacia
pAGE17	λ gt11AGE17 の挿入断片を pUC118 の <i>EcoRI</i> 部位に再クローン化したもの	本研究
pBAGE177	λ gt11AGE17 の挿入断片を含む 2.0 kb を Bluescript(KS ⁺) の <i>SmaI</i> 部位に T7 プロモーターに対して順方向にクローン化したもの	本研究
pBAGE173	λ gt11AGE17 の挿入断片を含む 2.0 kb を Bluescript(KS ⁺) の <i>SmaI</i> 部位に T7 プロモーターに対して逆方向にクローン化したもの	本研究
phemG	大腸菌 <i>hemG</i> 遺伝子を含む 11.7 kb の <i>PstI</i> 切断断片を pUC118 にクローン化したもの	本研究
p Δ hemG	phemG の <i>EcoRI</i> 部位に pUC4-KAPA 由来のカナマイシン耐性遺伝子カセットを挿入したもの	本研究
phemN	LE392 由来の <i>hemN</i> 遺伝子を含む 2.0 kb を pUC118 の <i>BamHI</i> 部位にクローン化したもの	本研究
phemF	LE392 由来の <i>hemF</i> 遺伝子を含む 1.4 kb を pUC118 の <i>BamHI</i> 部位にクローン化したもの	本研究
p Δ hemF	phemF の <i>PshAI</i> 部位に pHSG399 由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子カセットを挿入したもの	本研究
pLFO	LE392 由来の <i>amiA-hemF</i> オペロンを含む 2.1 kb を pMW118 の <i>EcoRI</i> 部位にクローン化したもの	本研究
pNFO	N13 由来の <i>amiA-hemF</i> オペロンを含む 2.1 kb を pMW118 の <i>EcoRI</i> 部位にクローン化したもの	本研究

表 2-2 続き

クローン	関連した特徴	由来または文献
pLFZ	LE392 由来の <i>amiA-hemF</i> オペロンの 5' 領域 587 bp を pMC1871 由来の <i>lacZ</i> に融合させ、pMW118 の <i>EcoRI</i> 部位にクローン化したもの	本研究
pNFZ	N13 由来の <i>amiA-hemF</i> オペロンの 5' 領域 587 bp を pMC1871 由来の <i>lacZ</i> に融合させ、pMW118 の <i>EcoRI</i> 部位にクローン化したもの	本研究
pΔSal	大腸菌 <i>prfA</i> 遺伝子と <i>hemK</i> 遺伝子を含む 4.1 kb を pUC19 の <i>SalI-HindIII</i> 部位にクローン化したもの	本研究
pΔhemK	pΔSal の <i>SacII-KpnI</i> 部位に pHSG399 由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子をクローン化したもの	本研究
phemK	<i>hemK</i> 遺伝子を含む 2.2 kb を pUC19 の <i>SmaI-HindIII</i> 部位にクローン化したもの	本研究
pprfA	<i>prfA</i> 遺伝子を含む 2.5 kb を pMW118 の <i>SalI-EcoRI</i> 部位にクローン化したもの	本研究
pRRB	LLR201 由来の <i>prfB</i> 遺伝子を含む 1.6 kb を pUC118 の <i>EcoRI-HincII</i> 部位にクローン化したもの	本研究
pLRB	LE392 由来の <i>prfB</i> 遺伝子を含む 1.6 kb を pUC118 の <i>EcoRI-HincII</i> 部位にクローン化したもの	本研究
pBRhemA-lacZ	大腸菌 <i>hemA</i> 遺伝子の 5' 領域 1.5 kb に <i>lacZ</i> 遺伝子を連結し、pBR322 の <i>BamHI</i> 部位にクローン化したもの	Nakayashiki <i>et al.</i> , 1995b
pHAZ	<i>hemA</i> 遺伝子の 5' 領域 1.5 kb に pMC1871 由来の <i>lacZ</i> 遺伝子を連結し、pMW118 の <i>BamHI</i> 部位にクローン化したもの	本研究
pHBZ	<i>hemB</i> 遺伝子の 5' 領域 1.8 kb に MC1871 由来の <i>lacZ</i> 遺伝子を連結し、pMW118 の <i>HindIII-SmaI</i> 部位にクローン化したもの	本研究
ファージ		
λgt11	クローニングベクター	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
λgxx1	大腸菌 <i>hemG</i> 遺伝子を含む 0.9 kb を λi ²¹ nin5 の <i>PmaCI</i> 部位にクローン化したもの	Nishimura <i>et al.</i> , 1995a
λgt11AGE17	1.7 kb のシロイヌナズナプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする cDNA を λgt11 の <i>EcoRI</i> 部位にクローン化したもの	本研究

Amp^r、アンピシリン耐性；Km^r、カナマイシン耐性；Cm^r、クロラムフェニコール耐性

表 2-3 各培地の組成 (1 リットルあたり)

LB	Bacto-tryptone (Difco)	10 g
	Bacto-yeast extract (Difco)	5 g
	NaCl	5 g
	Agar powder (Difco) (固体培地の場合)	15 g
λ	Bacto-tryptone (Difco)	10 g
	NaCl	5 g
	Agar powder (Difco) (固体培地の場合)	15 g
NZM	NZ amine type A (Humko Sheffield)	10 g
	NaCl	5 g
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	2 g
Terrific	Terrific broth (Difco)	47.6 g
	グリセロール	4 ml

2-5. 遺伝子欠失大腸菌株の作製

2-5-1. *hemG* 遺伝子欠失大腸菌株の作製

hemG 遺伝子とその近傍を含む 11.7 kb の *Pst*I 断片を pUC118 (Sambrook *et al.*, 1989) にクローン化したプラスミド (phemG) は、*hemG* 変異株 VSR800 (Nishimura *et al.*, 1995a) を相補するクローンとして大腸菌 W3110 ゲノムライブラリーから選択した。*hemG* 遺伝子を欠失させるために phemG を *hemG* 遺伝子内に認識部位のある *Eco*RI で切断し、pUC4-KAPA (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 由来のカナマイシン耐性遺伝子カセットに置き換えた (図 2-1)。カナマイシン耐性遺伝子に置換した *hemG* 遺伝子とその近傍を *Pst*I で切断して分離し、大腸菌 JC7623 (Kushner *et al.*, 1971) にエレクトロポレーション法 (Dower *et al.*, 1988) で導入した。相同組替えによって野生型 *hemG* 遺伝子が *hemG* 欠失形質に置き換わった株をカナマイシンを含む LB 培地で選択し、JG285 と命名した。JG285 由来の P1 ファージ液を用いた P1 形質導入 (Ikeda and Tomizawa, 1965) によって *hemG* 欠失形質を LE392 (Sambrook *et al.*, 1989) に導入し、得られた株を LG285 と命名した。

2-5-2. *hemF* 遺伝子欠失大腸菌株の作製

hemF 遺伝子とその近傍を含む 1.4 kb のフラグメントを LE392 ゲノム DNA から PCR 法を用いて増幅し、pUC118 の *Bam*HI 部位にクローン化した (phemF)。高コピープラスミド pHSG399 (Takeshita *et al.*, 1987) を *Acc*II で切断して得たクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む断片を phemF の *hemF* 遺伝子内にある *Psh*AI 部位に挿入し、*hemF* 欠失形質を含むプラスミド (pΔ*hemF*) を作製した。pΔ*hemF* を用い、上記の方法に従って *hemF* 遺伝子欠失大腸菌株を作製した。

2-5-3. *hemK* 遺伝子欠失大腸菌株の作製

小原らのクローン #247 (Kohara *et al.*, 1987) を *Sal*I と *Hind*III で切断することによって *prfA* 遺伝子と *hemK* 遺伝子を含む DNA 断片を分離し、pUC19 (Sambrook *et al.*, 1989) の *Sal*I-*Hind*III 部位にクローン化し、pΔ*Sal* を得た。pΔ*Sal* を *hemK* 遺伝子内にある *Sac*II と *Kpn*I 部位で切断し、pHSG399 由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子に置換した (pΔ*hemK*)。*hemK* 遺伝子欠失大腸菌株の作製は上記の方法に従った。

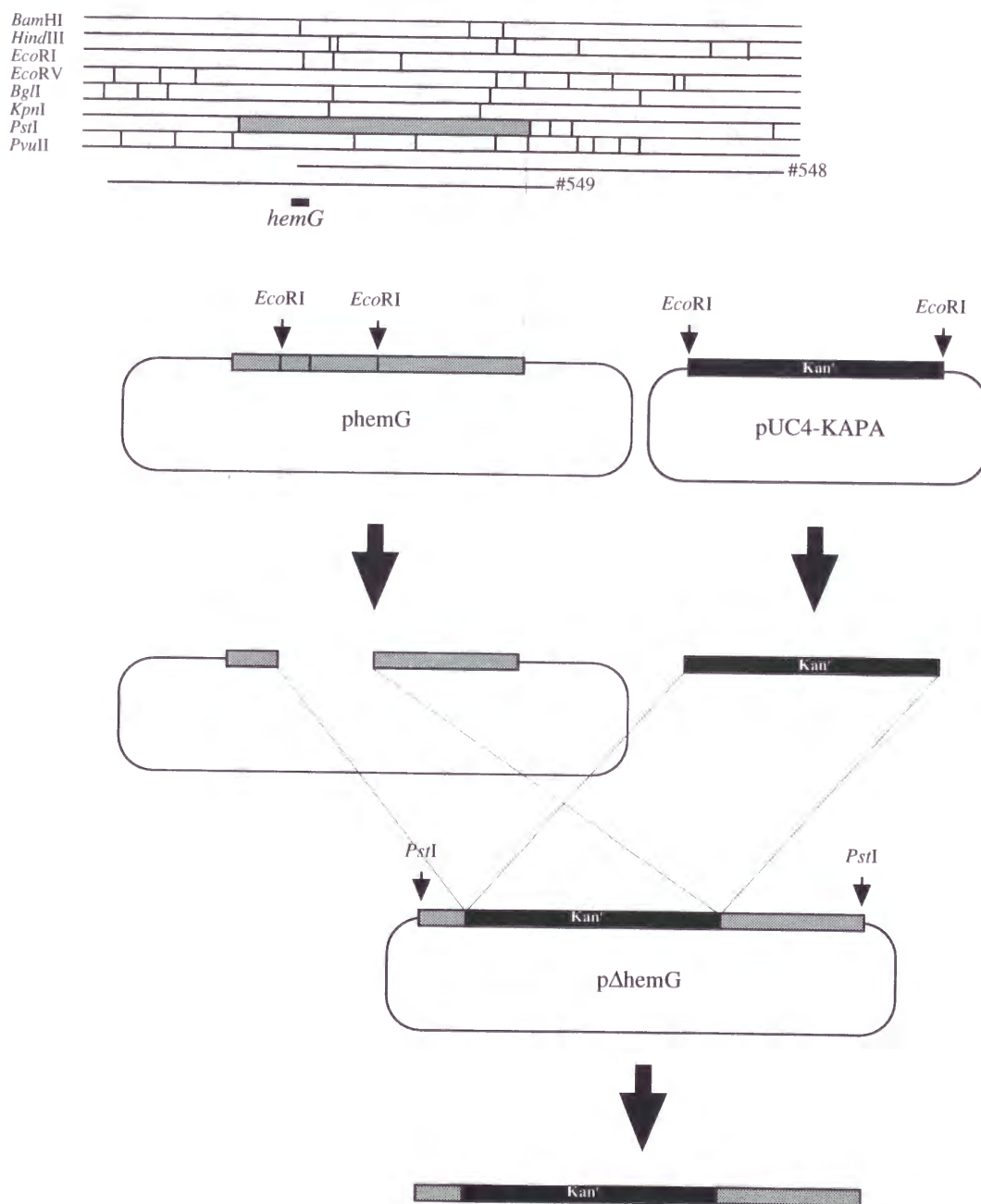


図 2-1 *hemG* 欠失変異の作製方法

hemK 遺伝子を含む *Eco*RI 切断断片をカナマイシン耐性遺伝子カセットに置き換えた断片の作製手順を示した。

2-6. 大腸菌の変異原処理

N-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (MNNG) による突然変異の誘発は Miller の方法 (Miller, 1972) に従った。大腸菌一夜培養液を遠心して集菌した後、等量の 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) で 2 回洗浄し、MNNG を最終濃度 100 µg / ml で加えて 37℃ で培養した。1 時間後、集菌し等量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 2 回洗浄して MNNG を除き、希釈して LB 培地にプレートした。37℃ で一夜培養した後、増殖が良くなった変異株を選択した。

2-7. 大腸菌ゲノムライブラリーの作製

大腸菌ゲノム DNA の分離は文献 (Current protocols in molecular biology, Ausubel *et al.*, 1987) に従った。*hemG* 遺伝子欠失株からの復帰変異株のゲノムライブラリーは、ゲノム DNA を *Sau*3AI で部分切断し、*Bam*HI で切断し脱リン酸化した pUC118 につないで作製した。*hemK* 遺伝子欠失株からの復帰変異株のゲノムライブラリーは、ゲノム DNA を *Eco*RI で切断し、脱リン酸化した pUC118 の *Eco*RI 切断部位につないで作製した。

2-8. 細胞内に蓄積したポルフィリンの抽出と測定

ポルフィリン類の抽出は Cox らの方法 (Cox and Charles, 1973) に従った。大腸菌は 37℃、暗所で一夜培養した。培養液を遠心、集菌した後、滅菌水で 1 回洗浄し、OD 600 = 2.0 になるように希釈して 1 ml を集菌した。酢酸エチル / 無水酢酸混合液 (3 : 1, v / v) に懸濁した。超音波細胞破碎装置 (Bioruptor; 東湘電機、横浜) を使用して菌体を破碎 (30 秒を 5 回) した後、滅菌水で 1 回洗浄して酢酸を除き、等量の 3N 塩酸を加えてポルフィリン類のみを塩酸層に移した。ポルフィリン濃度は紫外可視分光光度計を用いて 400 nm 付近の吸光ピークを測定して決定した。

2-9. 酵素活性の測定

2-9-1. プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性の測定

プロトポルフィリノーゲンの調整、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性の測定は Jacobs らの方法 (Jacobs and Jacobs, 1982) に従った。大腸菌は指数増殖期まで培養し、滅菌水で洗浄後、緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 % グリセロール) に懸濁した。超音波処理 (30 秒を 5 回) した反応液にプロトポルフィリノーゲンを加え、37℃ (シロイヌナズナの cDNA クローンの際は 32℃) にて 30 分間反応させた。反応液 200 µl の組成は以下の通りである: 100 mM Tris-HCl, pH8.7, 10 mM 2-メルカプトエタノール、0.3 % Tween 20、

5 mM EDTA、5 mM プロトポルフィリノーゲン IX、細胞破碎液の上清。形成されたプロトポルフィリン濃度は紫外可視蛍光吸光分光光度計を用いてプロトポルフィリンに固有の蛍光（403 nm の励起光に対する 633 nm の発光；Rebeiz *et al.*, 1974）をもとに測定した。真のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性は、細胞破碎液を加えない反応液中で形成される自動酸化によるプロトポルフィリノーゲン濃度を基準値とし、タンパク質量による平均化を行って算出した。なお、タンパク質量は Coomassie brilliant blue (Bradford, 1976) を用いて算出した。

2-9-2. コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性の測定

コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性の測定は Kohno らの方法 (Kohno *et al.*, 1993) に従った。反応液 200 μ l の組成は以下の通りである：10 mM Tris-HCl, pH 7.4、10 mM 2-メルカプトエタノール、10 mM コプロポルフィリノーゲン III、細胞破碎液の上清。37℃ で 30 分反応させ、形成されたプロトポルフィリノーゲン IX は蛍光燈下に置きプロトポルフィリン IX に酸化し、高速液体クロマトグラフィー (Rossi *et al.*, 1993) を用いて測定した。

2-10. 融合遺伝子の作製

2-10-1. *amiA-lacZ* 融合遺伝子の作製

amiA-hemF オペロンの上流領域 221 bp とコーディング領域 366 bp を含む 587 bp の *EcoRI*-*Bgl*III 切断断片を pLFO 及び pNFO (表 2-2) から分離し、*lacZ* 融合遺伝子作製用ベクター pMC1871 (Amersham Pharmacia) の *Bam*HI 部位に挿入した。融合遺伝子を *EcoRI* で切断して分離し、pMW118 (ニッポンジーン、富山) の *EcoRI* 部位に導入した。*amiA-lacZ* 融合遺伝子を含むプラスミドクローン (pLFZ 及び pNFZ) を DH5 α に導入し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

2-10-2. *hemA-lacZ* 融合遺伝子の作製

中屋敷ら (Nakayashiki *et al.*, 1995b) が作製した pBRhemA-*lacZ* は *hemA* 遺伝子上流領域 1.0 kb とコーディング領域 0.5 kb を pMC1871 由来の *lacZ* 遺伝子に融合させ、プラスミドベクター pBR322 (Sambrook *et al.*, 1989) にクローン化したものである。pBRhemA-*lacZ* の挿入配列を *Bam*HI で切断して分離し、pMW118 の *Bam*HI 部位に挿入したクローン (pHAZ) を作製し、*hemA* プロモーター活性の測定に使用した。大腸菌株は CA293 (Altman *et al.*, 1971) を使用した。

2-10-3. *hemB-lacZ* 融合遺伝子の作製

hemB 遺伝子上流領域 1.3 kb とコーディング領域 0.5 kb を含む 1.8 kb の *Sma*I-*Pst*I 切断断片は、小原らのクローン #140 (Kohara *et al.*, 1987) から調整した。この切断断片を

pMC1871 の *Pst*I 部位で *lacZ* 遺伝子と融合させ、pMW118 の *Hind*III-*Sma*I 部位にクローン化した (pHBZ)。大腸菌株は CA293 を使用した。

2-11. β -ガラクトシダーゼ活性の測定

β -ガラクトシダーゼ活性は Miller の方法 (Miller, 1972) に従って測定した。初期指数増殖期に集菌した大腸菌株を用い、各測定は 3 回行って平均を算出した。

2-12. プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする cDNA の単離

シロイヌナズナ cDNA ライブラリー (*Arabidopsis thaliana* L. columbia 5'-Stretch cDNA library) は Clontech (Palo Alto, USA) から入手した。cDNA ライブラリーを増幅後、大腸菌 *hemG* 変異株 VSR800 に感染させ λ プレート上で 32°C で 2 日間培養した。プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする cDNA クローン (λ gt11AGE17) は、VSR800 に対してクロスストリークを行い相補性を確認した。 λ gt11AGE17 の挿入配列を pUC118 に再クローン化した pAGE17 については、エレクトロポレーション法で VSR800 に導入し、コロニーの大きさの比較及び液体培地中での増殖率を測定して相補性のテストを行った。

2-13. *in vitro* でのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼタンパク質の合成

in vitro でのシロイヌナズナプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼタンパク質の合成にはシロイヌナズナプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ cDNA クローン pBAGE177 を用いた。T7 RNA ポリメラーゼを用いてプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの mRNA を合成し (Riboprobe kit; Promega, Madison, USA)、ウサギ網状赤血球抽出液中で翻訳しビオチン化リシル tRNA でラベルした (ECL *in vitro* translation system; Amersham Pharmacia)。これを SDS-ポリアクリルアミドゲル (10%) で電気泳動後メンブレンへ転写し (Sambrook *et al.*, 1989)、HRP 標識ストレプトアビジン複合体と ECL ウェスタンブロットティング検出試薬を用いて化学発光させ、X 線フィルムに 24 時間露光した。

2-14. ハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーションに用いたメンブレンはカリフォルニア大学生物学部の伊藤寿朗博士ら (Ito *et al.*, 1994) が作製されたものをお借りした。プローブには [32 P] でラベルしたシロイヌナズナプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ cDNA の 1318 bp の *Eco*RI 断片を用いた。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションは 42°C で行い、洗いは 2 \times SSC / 0.1 % SDS で 42°C で 20 分間ずつ 4 回、65°C で 1 回、0.5 \times SSC / 0.1 % SDS で 65°C で 10 分間を 1 回行った。IP フィルムに 48 時間露光し、富士写真フィルム (東京) のイメージアナライザー (BAS-2000) で解析した。

2-15. DNA 塩基配列の決定と解析

大腸菌 *amiA-hemF* オペロン、*prfB* 遺伝子の変異部位の決定とシロイヌナズナプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする cDNA の塩基配列の決定には、エクソヌクレアーゼ III による部分分解を用いて作製した欠失プラスミドを使用した。反応には Sequenase Ver. 2 kit (United States Biochemical, Cleveland, USA) を用いた。DNA 塩基配列およびアミノ酸配列の解析などには解析プログラム: GENETYX-MAC Ver. 8.0 (ソフトウェア開発、東京)、マルチアライメントには CLUSTAL W Ver. 1.4 (Thompson *et al.*, 1994) を使用した。相同性の検索には FASTA (Pearson and Lipman, 1988)、BLAST (Altschul *et al.*, 1990) 等のプログラムと Smith and Watermann のアルゴリズム (Smith and Waterman, 1981) による MP search を用いた。DNA データベースには GenBank、EMBL、DDBJ を、タンパク質データベースには SWISS-PROT、PIR、PRF、PDBSTR を利用した。PCT (International application published under the Patent Cooperation Treaty) を用いた特許検索は、住友化学株式会社生命工学研究所の長澤秋都氏にお願いした。

2-16. PCR に使用したプライマー

大腸菌 *hemF* 遺伝子のコーディング領域を増幅するのに用いたプライマーの塩基配列を以下に示した。

5'-ATC GCC ACA GCG ATT GCT GA-3'
5'-AAA ATC TCC ATC AGC CTG CA-3'

大腸菌 *amiA-hemF* オペロンを増幅するのに用いたプライマーの塩基配列を以下に示した。

5'-GAA TTC GTT ACC TTT TTG CGG G-3'
5'-GAA TTC TGG CAT CTG GGG CAA T-3'

大腸菌 *hemN* 遺伝子を増幅するのに用いたプライマーの塩基配列を以下に示した。

5'-GGA TCC ACG TAT TGG CAG TAA-3'
5'-GGA TCC GGC CTA CAA AAG CAA T-3'

大腸菌 *prfB* 遺伝子を増幅するのに用いたプライマーの塩基配列を以下に示した。

5'-TTT GCC GTC GAA TTC TGC GT-3'

5'-GAC CAT GGA AGT GGC GCA GC-3'

2-17. その他の方法

大腸菌、ファージの取り扱い、プラスミドの調整、制限酵素処理、クローニングなどの基本的な遺伝子操作は文献（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *et al.*, 1989）に従った。

第3章 実験結果

第1節 酸素依存型コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼの プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性

3-1-1. 大腸菌 *hemG* 欠失変異株の作製と復帰変異株の分離

大腸菌 *hemG* 遺伝子とその近傍をクローン化したプラスミド (*phemG*) の *hemG* 遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子で置換し、*pΔhemG* を作製した。*pΔhemG* の挿入断片を大腸菌 JC7623 に導入し、カナマイシン耐性株を選択することによって *hemG* 遺伝子欠失変異株 JG285 を得た。次いで JG285 から P1 形質導入により *hemG* 欠失変異を LE392 に導入し、LG285 を得た。JG285、LG285 は LB 寒天培地上で小さいコロニーを形成し、液体培地で増殖も悪かった。また、*hemG* 遺伝子のみを挿入した λ クローン、 λ gxx1 (Nishimura *et al.*, 1995a) を導入することによって増殖が回復した (図 3-1、図 3-2)。

申請者らは最近、培地中に加えたヘム酸化物に依存して増殖を回復する大腸菌変異株 VS212 (Nakayashiki *et al.*, 1997) を解析し、大腸菌染色体上約 43 分に存在する機能未知の *yedD* 遺伝子に変異が起きることにより培地中のヘム酸化物を透過するようになることを見出した。LG285 に変異型 *yedD* 遺伝子を導入したところ、培地中に加えたヘム酸化物に依存して増殖が回復した (図 3-3)。

LG285 を変異原処理することにより、*hemG* 遺伝子を欠失するにも関わらず増殖が回復した復帰変異株を 3 株 (N11、N13、N17) 分離した。これらの復帰変異株は好氣的条件では LB 寒天培地上で大きいコロニーを形成し、液体培地中での増殖も良くなっていた (図 3-1、図 3-2)。嫌氣的条件での増殖では、LE392 が LB 寒天培地上で好氣的条件下と同様に増殖したのに対し、N11、N13、N17 の増殖は LG285 並みに悪化した (図 3-1)。

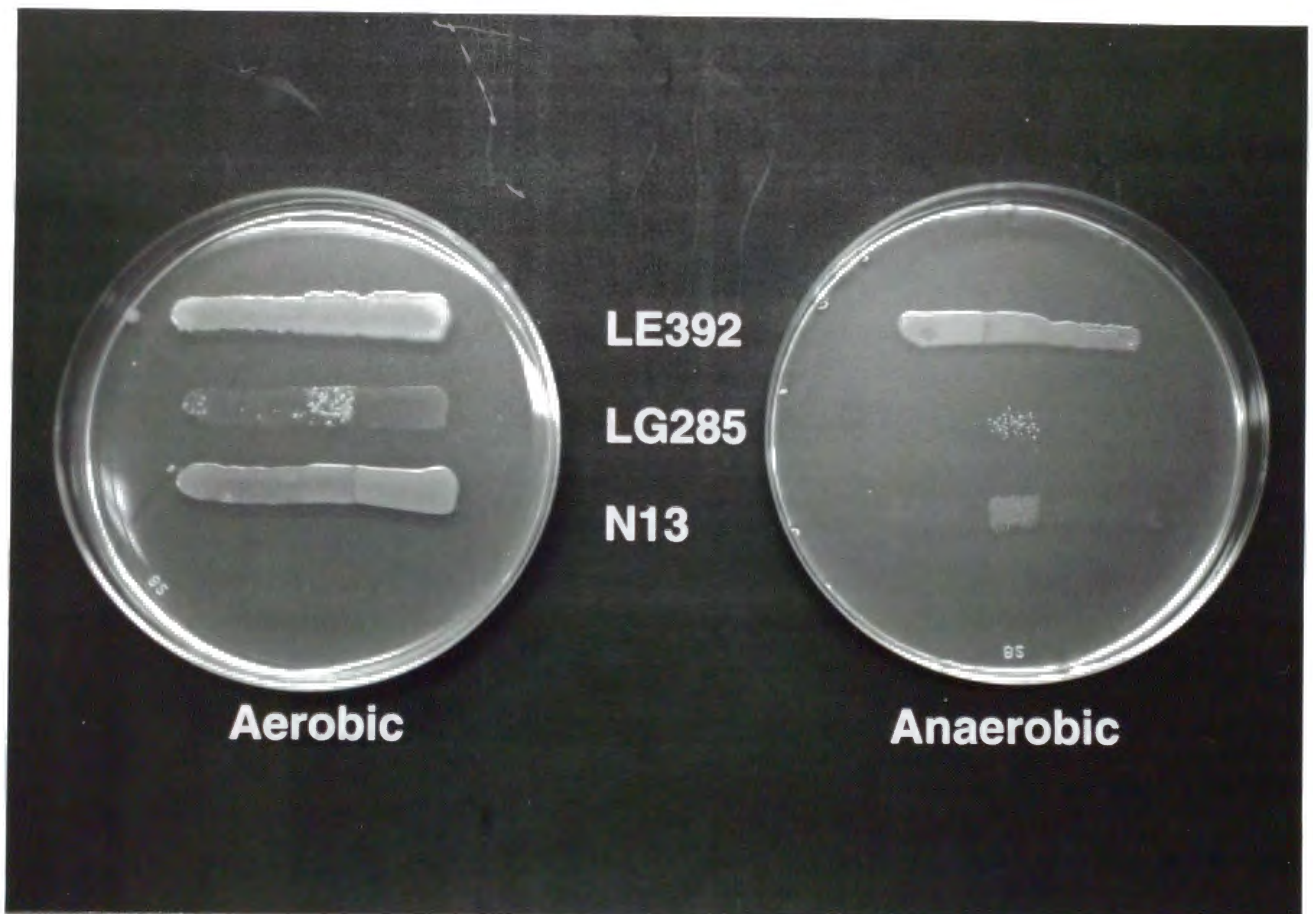


図 3-1 大腸菌 *hemG* 遺伝子欠失変異株 LG285 と復帰変異株 N13

λ プレートに縦方向にぬりつけた λ_{gxx1} に対して大腸菌一夜培養液を横方向に交叉させて塗りつけた。プレートは好氣的条件または嫌氣的条件で 37℃で 24 時間培養した。

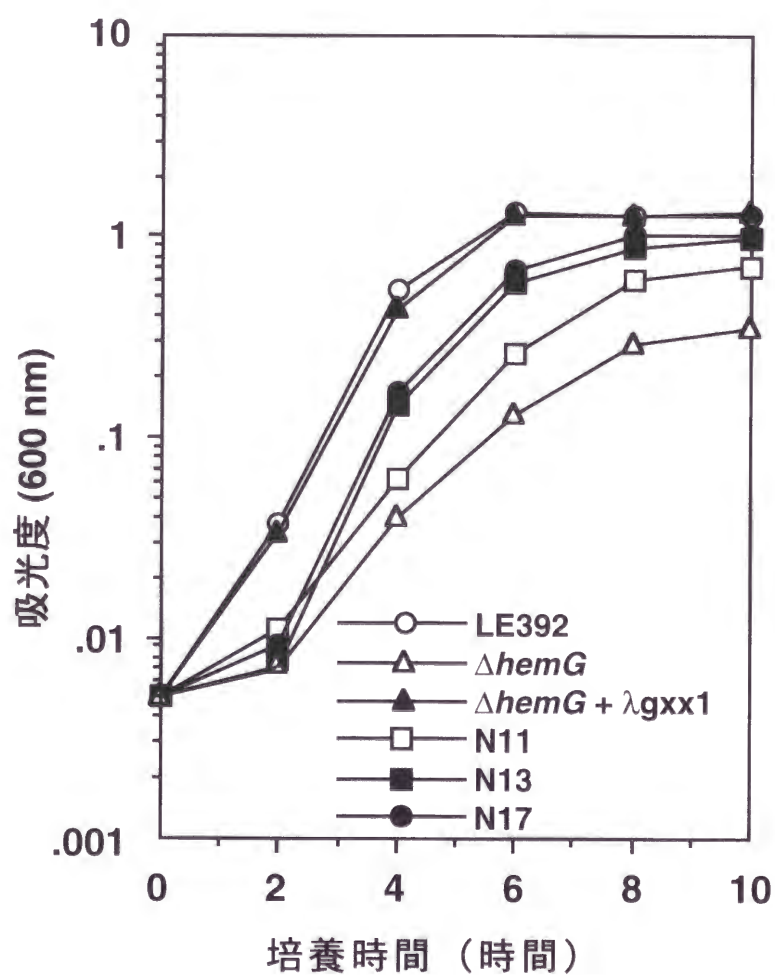


図 3-2 LG285 と N11、N13、N17 の液体培地中での増殖

LB 液体培地中での各大腸菌株の増殖を測定した。

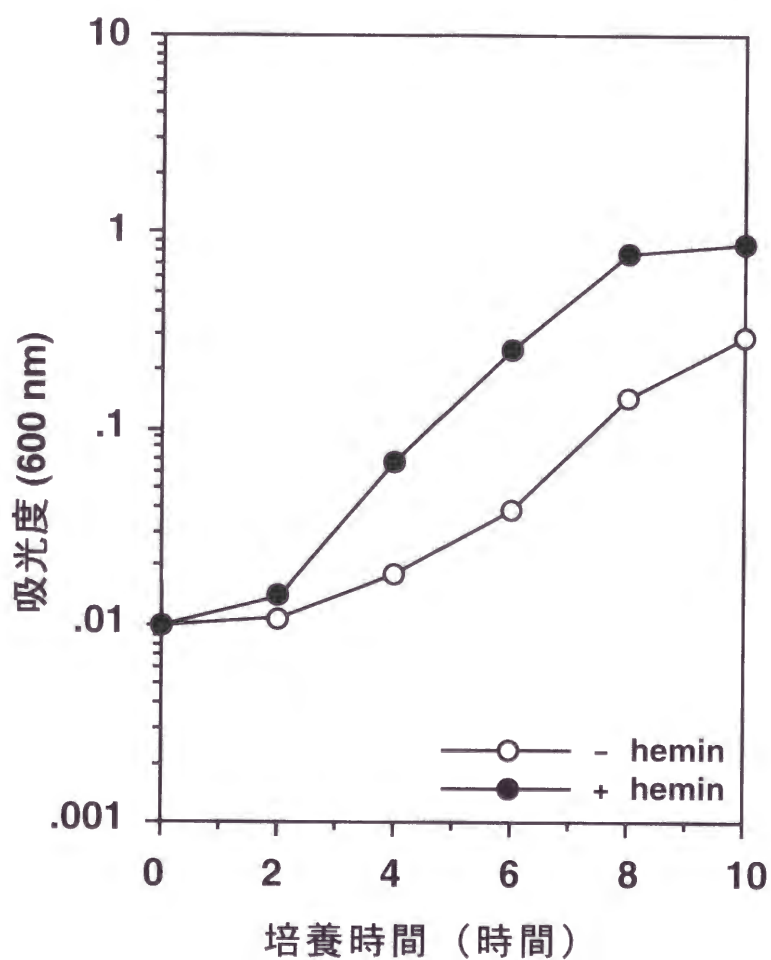


図 3-3 培地中に加えたヘム酸化物による LG285 の相補

ヘム酸化物を細胞中に透過するように変異型 *yedD* 遺伝子を pMW118 にクローン化して LG285 に導入し、ヘム酸化物を含む LB 液体培地 (+ hemin) と含まない LB 液体培地 (- hemin) で増殖を測定した。

3-1-2. *hemG* 欠失変異をサプレスする遺伝子の同定

hemG 欠失変異株からの復帰変異株において、増殖の回復に寄与している遺伝子を同定するために、復帰変異株のゲノムライブラリーを作製し、LG285 に導入して増殖を回復させるクローンの選択を試みた。N13 ゲノム由来のライブラリーを LG285 に導入したところ、アンピシリン耐性となった約 10^4 のコロニーの中からコロニーサイズが大きくなった形質転換株が 4 個得られた。これらの形質転換株からプラスミドを分離し、LG285 に再び導入してコロニーサイズが大きくなることを確認した。各プラスミドクローンの挿入断片の塩基配列を決定し、DNA データベースに対して相同性検索を行ったところ、すべてのクローンが酸素依存型コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする *hemF* 遺伝子 (Troup *et al.*, 1994) のコーディング領域を含んでいることがわかった (図 3-4)。しかしながら、N13 由来の *hemF* 遺伝子の塩基配列はデータベースに登録されている配列 (Troup *et al.*, 1994; Blattner *et al.*, 1997) と同一であり、変異した塩基は含まれていなかった。

このため、*hemF* 遺伝子を含むプラスミドクローンによる LG285 の相補は *hemF* 遺伝子の過剰発現が原因であると考えた。これを証明するために LE392 ゲノム DNA から PCR 法を用いて *hemF* 遺伝子のコーディング領域を増幅し、pUC118 の *lacZ* プロモーターの下流にクローン化した (*phemF*)。LG285 に *phemF* を導入すると、予想通り増殖が回復した (図 3-5)

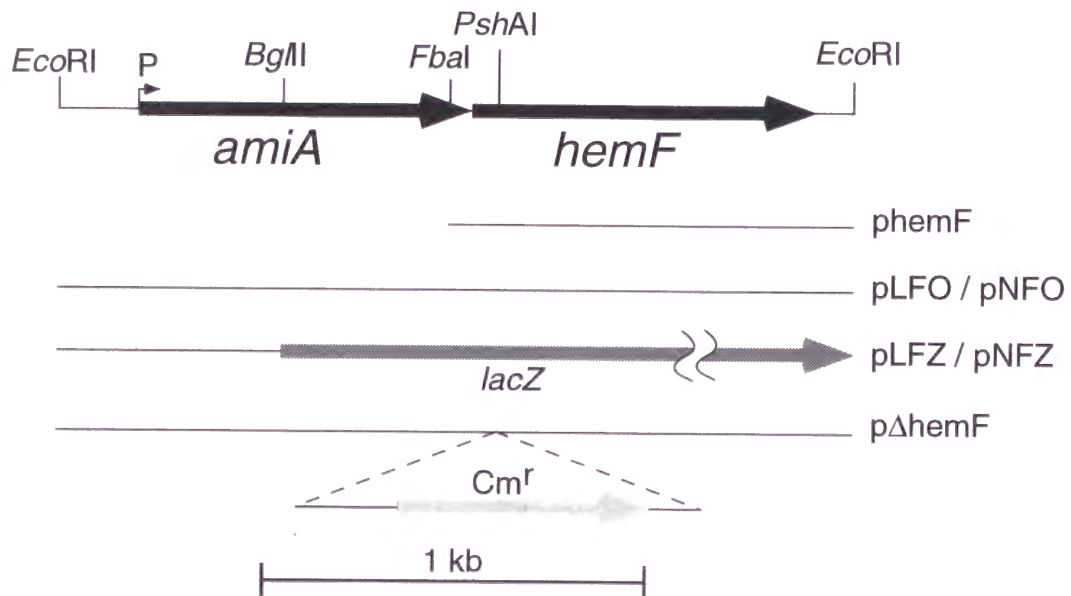


図 3-4 *hemF* 遺伝子付近の物理的地図

PCR 法を用いて増幅した 2.1 kb の *amiA-hemF* オペロンを含む領域の制限酵素認識部位を示した。P は *amiA* 遺伝子の 5' 領域に存在するプロモーターを示す。本研究で用いた代表的なクローンの挿入断片を制限酵素地図の下に示した。

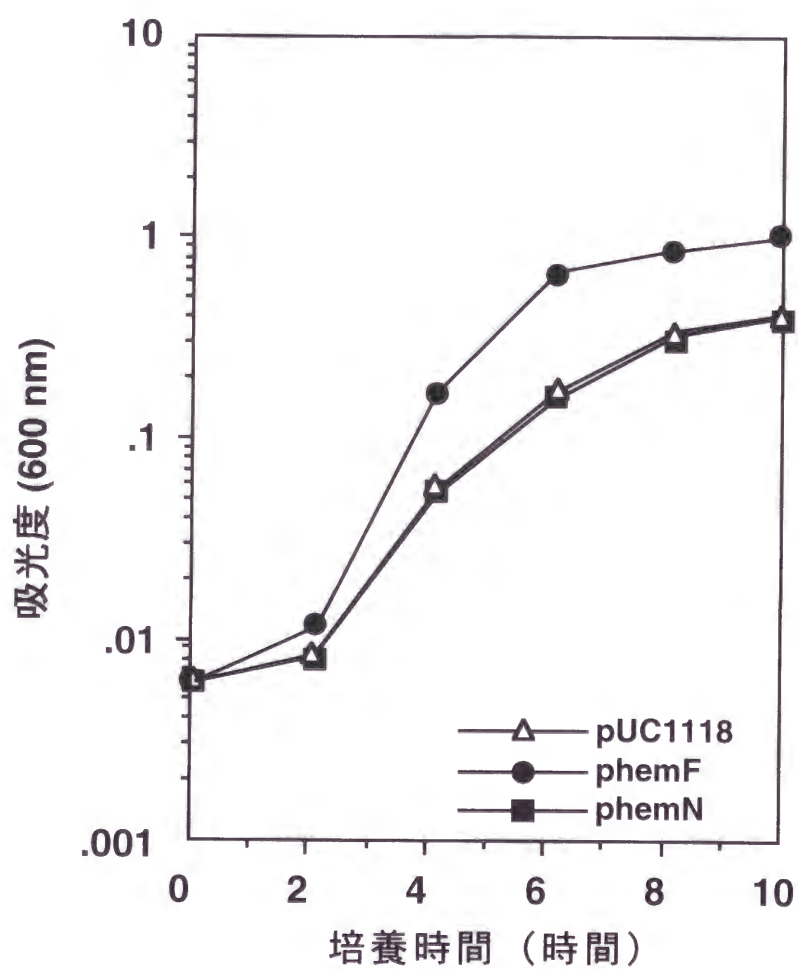


図 3-5 野生型 *hemF* 遺伝子の過剰発現による LG285 の相補

LG285 に pUC118、phemF、phemN を導入し、アンピシリンを含む LB 液体培地中での増殖を測定した。

3-1-3. *hemF* 遺伝子の過剰発現によるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性

phemF の導入によって実際にプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性が上昇しているかどうかを調べるために、LE392 に *phemF* を導入し、細胞破碎液中でのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を測定した。表 3-1 に示したように、*phemF* を導入した大腸菌細胞ではコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼだけでなくプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの活性も上昇していた。*phemG* を導入した大腸菌細胞ではプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性のみが上昇した。*phemN* を導入した大腸菌細胞でのコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性及びプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性は検出できなかった。これは、*hemN* 遺伝子がコードする酵素が他の補因子を要求するため (Dailey, 1990) であると考えられる。

3-1-4. *hemG* 欠失変異株からの復帰変異株 N13 の増殖は *hemF* 遺伝子に依存する。

大腸菌は酸素依存型と酸素非依存型の2種類のコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼを持っているため、酸素依存型の酵素に欠損があってもヘムを合成することができる。実際、LE392 の増殖は *hemF* 遺伝子内にクロラムフェニコール耐性遺伝子を挿入しても影響を受けなかった (図 3-6)。これに対し、N13 の *hemF* 遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子で中断した株では LG285 並みに増殖が悪化し、 λ gxx1 を用いて *hemG* 遺伝子を導入することによって増殖が回復した (図 3-6)。LG285 からの他の復帰変異株 (N11、N17) の増殖は *hemF* 遺伝子に依存しなかった (図 3-6)。

表 3-1 *hemF* 遺伝子の過剰発現によるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性¹

プラスミドクローン	酵素活性 ²	
	コプロポルフィリノーゲン オキシダーゼ	プロトポルフィリノーゲン オキシダーゼ
pUC118	N. D. ³	N. D.
p <i>hemF</i>	3.50	464
p <i>hemN</i>	N. D.	N. D.
p <i>hemG</i>	N. D.	688

¹ LE392 に各プラスミドクローンを導入し、50 µg / ml のアンピシリンを含む LB 液体培地中で培養した後、第 2 章に記した方法で反応液を調整した。

² 酵素活性の単位は、pmol protoporphyrin fomed / mg protein / h。

³ N. D.、検出不可能。

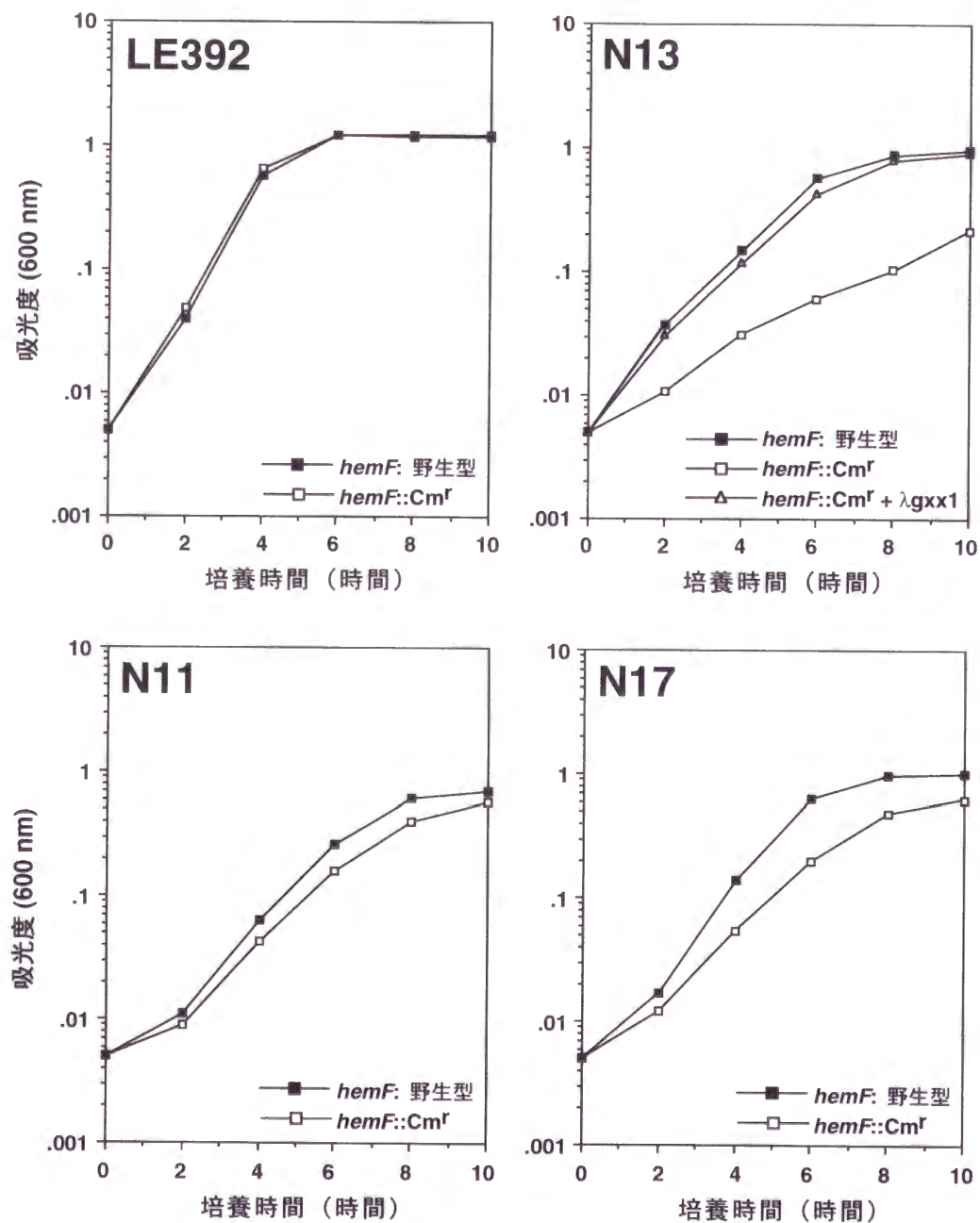


図 3-6 *hemF* 遺伝子欠失変異株の増殖

LE392、N11、N13、N17 について、それぞれから作製した *hemF* 遺伝子欠失変異株との増殖を比較した。N13 から分離した *hemF* 遺伝子欠失変異株については、 λ gxx1 を導入した際の増殖も測定した。

3-1-5. 復帰変異株 N13 の変異部位の同定

hemF 遺伝子は、細胞壁のペプチドグリカンの合成に参与する *N*-アセチルムラミル-L-アラニンアミダーゼをコードする *amiA* 遺伝子とオペロンを形成し（図 3-4）、*amiA* 遺伝子の 5'側にあるプロモーターから転写される（Troup *et al.*, 1994）。N13 は *hemF* 依存的に増殖を回復するにも関わらず *hemF* 遺伝子のコーディング領域に変異がなかったので、N13 の *amiA* 遺伝子の 5'上流領域に変異が起こっていると考え、以下の実験を行った。

amiA 遺伝子の 5'領域の 221 bp と *amiA*、*hemF* 遺伝子のコーディング領域 366 bp を LE392 及び N13 のゲノム DNA から PCR 法を用いて増幅し、低コピープラスミド pMW118 にクローン化した。LE392 由来の *amiA-hemF* オペロンを含むクローン（pLFO）を導入した LG285 では増殖は回復せず、N13 由来のクローン（pNFO）を導入した時のみ LG285 の増殖が回復した（図 3-7）。

次に、pLFO と pNFO の 5'領域に *lacZ* 遺伝子を融合させ、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定することによって *amiA* 遺伝子の 5'上流領域でのプロモーター活性を比較した。表 3-2 に示したように、N13 由来の *amiA-hemF* オペロンのプロモーター活性は LE392 由来のプロモーター活性の 3.7 倍に達した。嫌気的条件下で培養したところ、活性の差は小さくなったが、N13 由来のプロモーターは LE392 由来のプロモーターより 1.8 倍高い β -ガラクトシダーゼ活性を示した（表 3-2）。

pLFO 及び pNFO について、*amiA* 遺伝子の 5'領域の塩基配列を決定したところ、LE392 由来の配列はデータベースに登録されている配列（Troup *et al.*, 1994; Blattner *et al.*, 1997）と同一であるのに対し、N13 由来の配列には Troup ら（Troup *et al.*, 1994）が決定した転写開始点の下流約 30 bp の部位にシトシンからチミンへの塩基置換（transition）があることがわかった（図 3-8）。この変異により、 σ^{70} -依存型プロモーターのコンセンサス配列に近い配列が新たに生じており、これが N13 における *amiA-hemF* プロモーター活性の上昇の原因であると考えた。また、*amiA* 遺伝子の 3'側から *hemF* 遺伝子のみが転写されている可能性を考慮し、pNFO から *amiA* 遺伝子の 5'領域を欠失させたクローンを作製し LG285 に導入したが、増殖は回復しなかった。このため、*amiA* 遺伝子の 3'側にプロモーター活性はないと判断した。

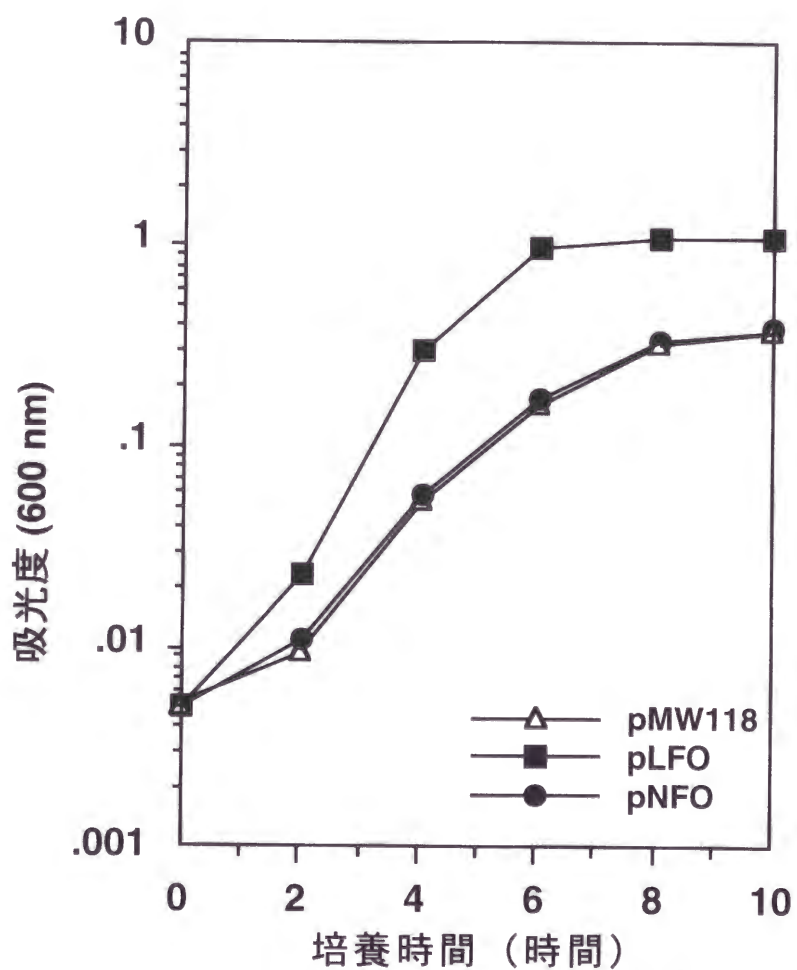


図 3-7 N13 由来の *amiA-hemF* オペロンによる LG285 の相補

LG285 に pMW118、pLFO、pNFO を導入し、アンピシリンを含む LB 液体培地中の増殖を測定した。

表 3-2 N13 における *amiA-hemF* オペロンのプロモーター活性¹

プラスミドクローン	由来	β-ガラクトシダーゼ活性 ²	
		好氣的条件	嫌氣的条件
pLFZ	LE392	337	242
pNFZ	N13	1243	439

¹ DH5αに各プラスミドクローンを導入し、50 μg/ml のアンピシリンを含む LB 液体培地中で 600 nm での吸光度が 0.35～0.5 になるまで培養した。

² β-ガラクトシダーゼは Miller の定義による単位（1 単位＝1 時間にタンパク質 1 mg によって加水分解される *o*-ニトロ-フェニル-β-D-ガラクトピラノシドの mmol 数 [Miller, 1972]）で表した。

```

1 attcggttacctttttgcgggttaaaggctgattatggcgtgaacggtcg 50

51 aattagccaatatctgacgaaaatcggttgaaaaagtggcataatgggga 100

101 gtgtgcaactattgaaatgaaaagttaaaagaattctcaacagcaaaccgt 150
      t
151 cgtaacggattacgcgatacgatataacatctggaactttattattacaa 200

201 ctcaggccggtatg

```

図 3-8 N13 の変異部位

amiA-hemF オペロンの 5'領域の塩基配列を示した。N13 においてチミンに置換していたシトシン残基をグレーで示した。Troup ら (Troup *et al.*, 1994) が指摘した σ^{70} -依存型プロモーターの-10 及び-30 領域を実線で、N13 におけるプロモーター活性の上昇に関与していると考えられる-10 及び-30 領域を破線で示した。黒で示した塩基は Troup ら (Troup *et al.*, 1994) が示した転写開始点である。

第2節 シロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする cDNA の解析

3-2-1. シロイヌナズナプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする cDNA クローンの分離

シロイヌナズナ cDNA ライブラリーを約 10^9 pfu/ml まで増幅した後、大腸菌 *hemG* 変異株 VSR800 に感染させて培養し、コロニーサイズが野生株並みに回復した形質転換体を選択した。増殖が回復した 28 コロニーからベクターファージの *cIts857* マーカーを利用した高温による誘発によってファージ液を調製した。各ファージ液を VSR800 とクロスストリークを行った結果、3 クローン (#1、#5、#21) が VSR800 を相補した。それぞれの DNA を分離して調べたところ、3 クローンすべてに 1.3 kb と 0.4 kb の 2 つの *EcoRI* 切断断片が同時にクローン化されていることがわかった。これらの 3 クローンは同一の挿入配列を含んでいると推定し、代表して #1 を λ gt11AGE17 と命名し、以後の解析に用いた。 λ gt11AGE17 及び大腸菌 *hemG* 遺伝子を含むクローン λ gxx1 による VSR800 の相補の様子を図 3-9 に示した。

pUC118 を *EcoRI* で切断し、5'末端をアルカリ性フォスファターゼで脱リン酸化したのち λ gt11AGE17 の 2 つの挿入断片を加えてライゲーション反応を行った。これを VSR800 に導入し、約 10^3 のアンピシリン耐性の形質転換体の中から LB 培地上で増殖が回復したコロニーを 4 株選択した。プラスミドを回収し、再び VSR800 に導入して増殖が回復することを確認した (図 3-10、図 3-11)。プラスミド DNA を *EcoRI* で切断して調べたところ、これらのクローンには λ gt11AGE17 と同様に 1.3 kb と 0.4 kb の 2 つの *EcoRI* 切断断片が挿入されており、*AccI*、*EcoRV* での切断パターンから 2 つの *EcoRI* 切断断片の方向はすべて λ gt11AGE17 と同方向であることがわかった。これら λ gt11AGE17 の挿入断片を再クローン化したプラスミドクローンを pAGE17 と命名した (図 3-12)。pAGE17 のどちらかの *EcoRI* 切断断片を挿入したプラスミドクローンや、2 つの *EcoRI* 切断断片を pAGE17 と逆方向でつないだプラスミドクローンは、VSR800 を相補しなかった。

pAGE17 を導入した VSR800 の増殖は、真核生物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを特異的に阻害する薬剤であるアシフルオルフェンによって阻害された (図 3-13)。これに対し、大腸菌野生型 *hemG* 遺伝子をもつ VS2003 の増殖は阻害されなかった。

3-2-2. プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性の測定

pAGE17 の導入による VSR800 の相補がプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性に起因していることを確認するため、pAGE17 を導入した大腸菌細胞破碎液中でのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を測定した。pAGE17 を導入した VSR800 の細胞破碎

液中のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性は 15.81 pmol protoporphyrin formed / mg protein / h で、pUC118 ベクターを導入したときの値 (0.77 pmol protoporphyrin formed / mg protein / h) の 20 倍に達した。

pAGE17 を導入した VSR800 の細胞破碎液中のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性は、反応液に加えたアシフルオルフェンの濃度にしたがって阻害された。これに対し、大腸菌野生型の *hemG* 遺伝子を持つ DH5 α の細胞破碎液中のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性は、同濃度のアシフルオルフェンでは顕著な阻害はみられなかった (図 3-14)。

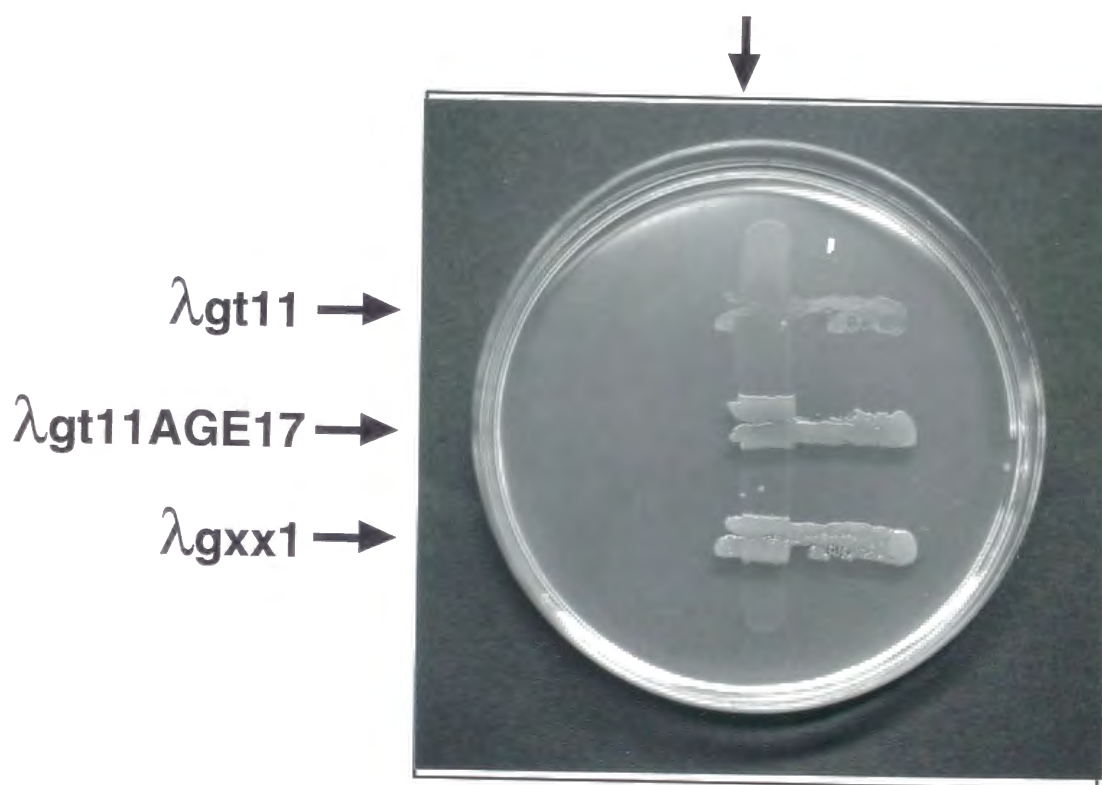
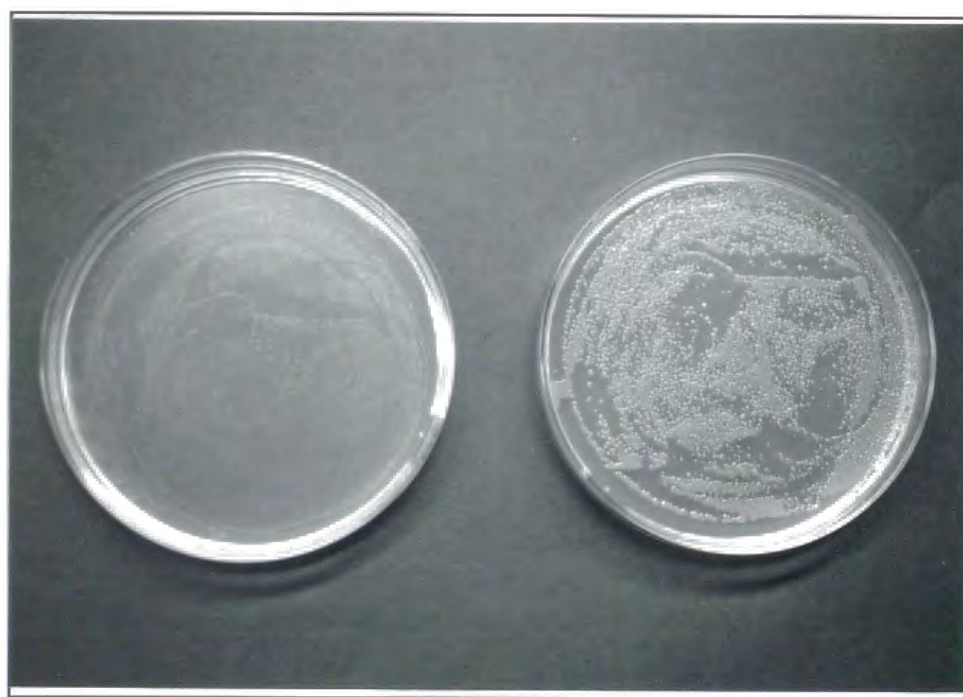


図 3-9 λgt11AGE17 及びλgxx1 による VSR800 の相補

λプレートに縦方向にぬりつけた VSR800 の菌液に対して各ファージ液を交叉させて塗った。プレートは 32℃で 24 時間培養した。



pUC118

pAGE17

図 3-10 pAGE17 による VSR800 の相補

VSR800 に pUC118 及び pAGE17 を導入し、アンピシリンを含む LB 寒天培地にまいた。プレートは 32℃で 24 時間培養した。

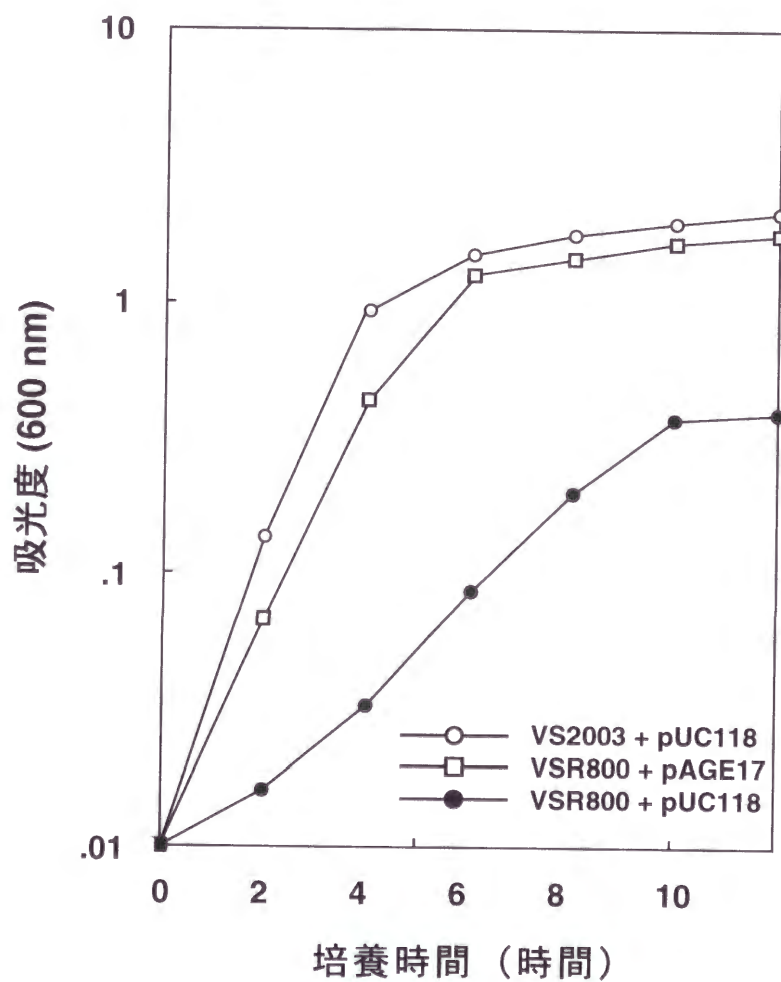


図 3-11 pAGE17 を導入した VSR800 の液体培地中での増殖

VS2003 (*hemG*: 大腸菌野生型)、VSR800 に pUC118 又は pAGE17 を導入し、アンピシリンを含む LB 液体培地中での増殖を測定した。

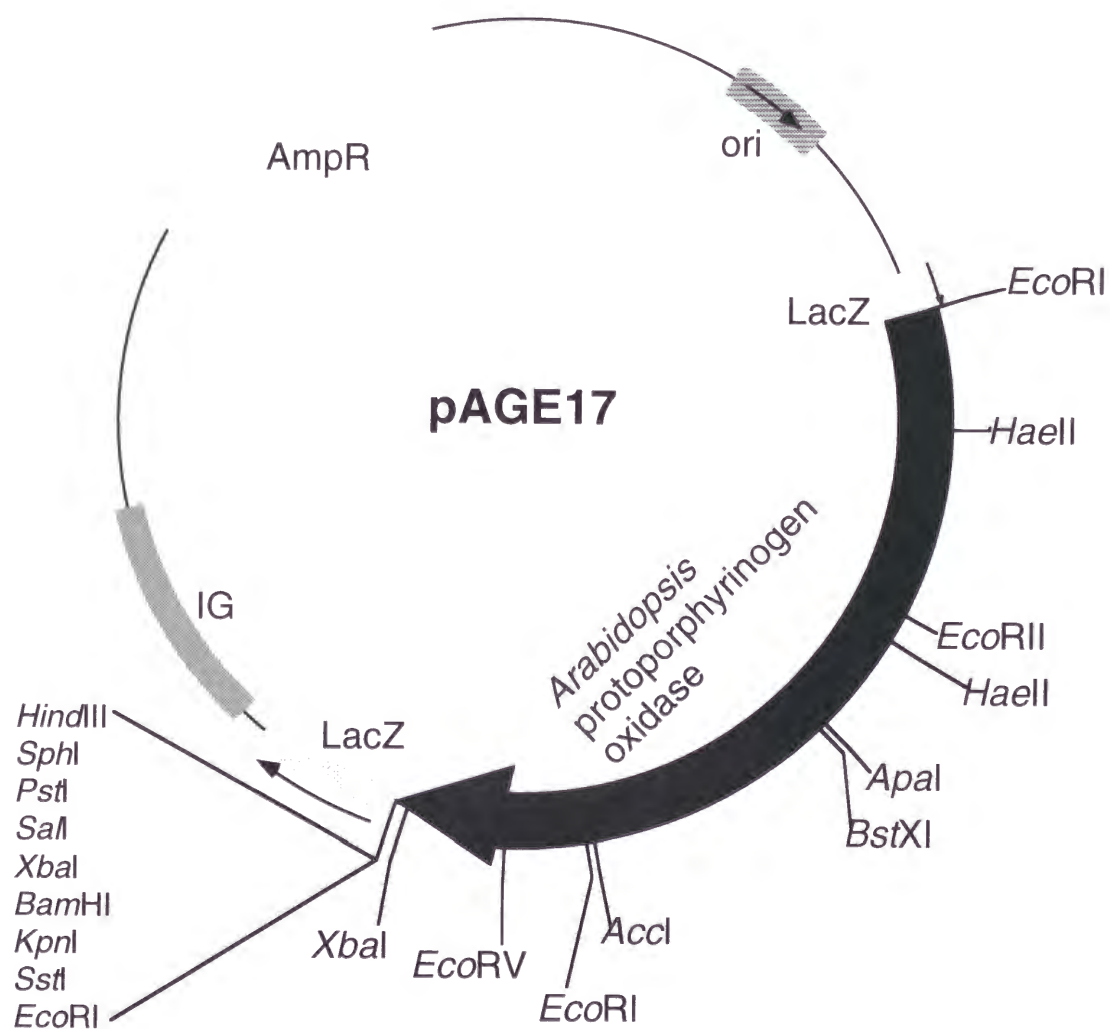


図 3-12 pAGE17 の制限酵素地図

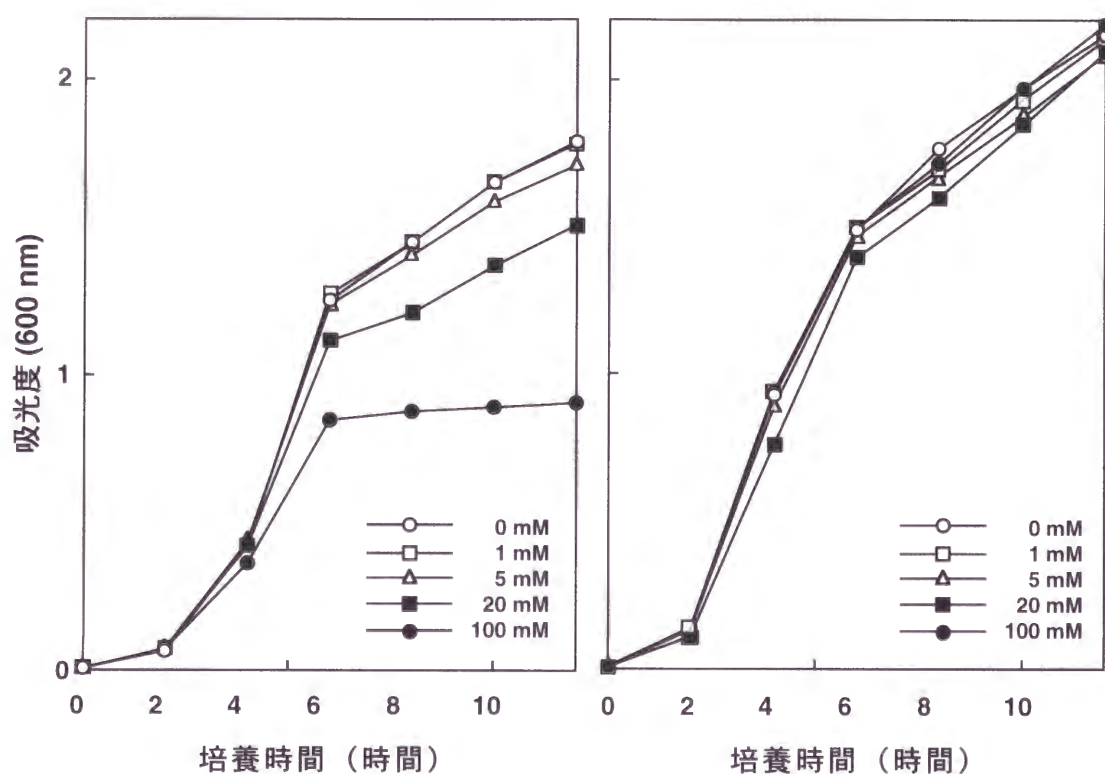


図 3-13 pAGE17 を導入した VSR800 の増殖のアシフルオルフェンによる阻害

VSR800 に pAGE17 を導入し、アンピシリンを含む LB 液体培地にアシフルオルフェンを図中の濃度で加えて培養を行った。

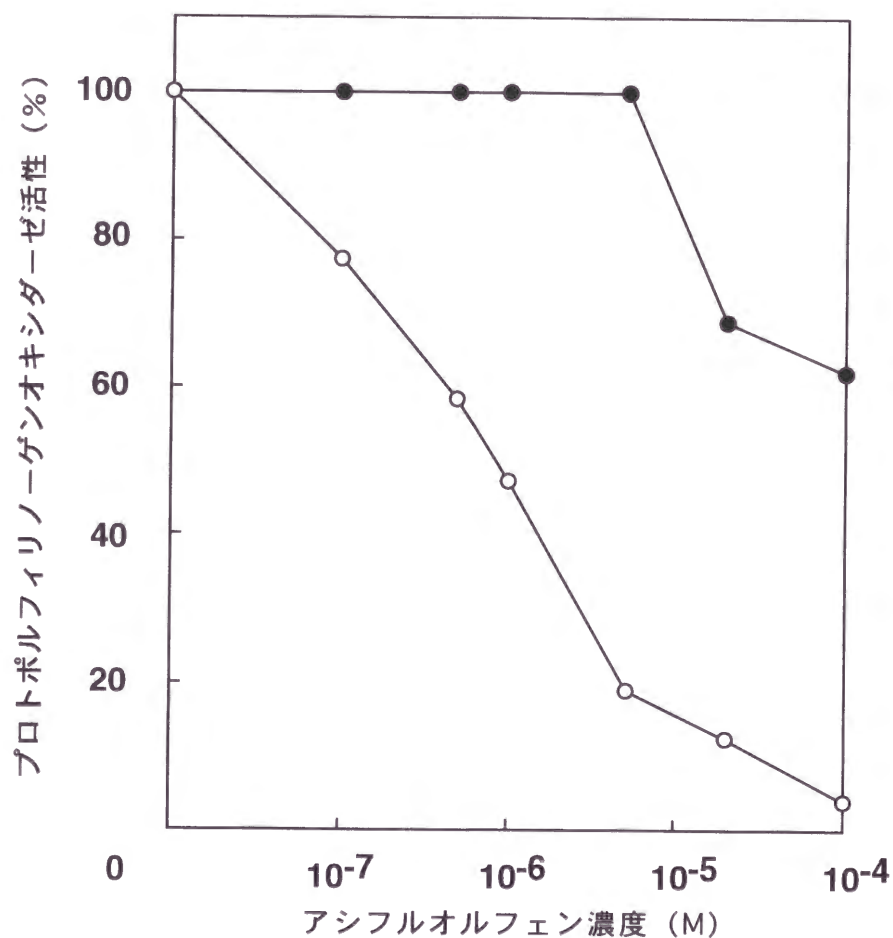


図 3-14 pAGE17 を導入した大腸菌細胞破砕液中のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性のアシフルオルフェンによる阻害

pAGE17 を導入した VSR800 (○) 及び DH5α (●) の細胞抽出液を用い、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性に対する反応液中加入したアシフルオルフェン濃度の影響を測定した。プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性は相対値で示した。アシフルオルフェンを加えない時のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性は、pAGE17 を導入した VSR800 では 15.81 pmol protoporphyrin formed / mg protein / h、DH5αでは 10.13 pmol protoporphyrin formed / mg protein / h である。

3-2-3. プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする cDNA の解析

pAGE17 の挿入断片の塩基配列を両鎖にわたって決定した。挿入断片は 1663 bp であり、537 アミノ酸をコードすると推定される 1 つの ORF を含んでいた (図 3-15)。アミノ酸一次配列から推定される分子量は 57.7 kD であった。

アミノ酸一次配列をもとにタンパク質データベースと相同性検索を行った結果、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (Hansson and Hederstedt, 1992) と 26 %、ヒト (*Homo sapiens*) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (Nishimura *et al.*, 1995b) と 22 %、マウス (*Mus musculus*) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (Taketani *et al.*, 1995; Dailey *et al.*, 1995) と 22 % の相同性があることがわかった (図 3-16)。特に、pAGE17 の塩基配列から推定されるシロイヌナズナプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼタンパク質の 60 残基目のバリンから 70 残基目のシステインにかけては、フラビンを含む酵素のジヌクレオチド結合部位に典型的な、63、65、68 残基目のグリシンが保存されていた (Brandsch *et al.*, 1987; Bach *et al.*, 1988; Ito *et al.*, 1988; Van Beeumen *et al.*, 1991; Lang *et al.*, 1991; Gari *et al.*, 1992)。また、他種のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼと比較すると、pAGE17 の塩基配列から推定されるアミノ酸配列にはアミノ末端に約 50 アミノ酸残基からなる付属的な配列が存在することがわかった。大腸菌プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (Sasarman *et al.*, 1993; Nishimura *et al.*, 1995a) との有効な相同性は認められなかった。

植物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼに関しては、最近タバコ (*Nicotiana tabacum*) とポテト (*Solanum tuberosum*) でそれぞれ 2 種類の cDNA が単離され、一方が葉緑体に、もう一方がミトコンドリアに局在することが報告された (Lermontova *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 1998)。pAGA17 の塩基配列から推定されるシロイヌナズナプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列と比較したところ、葉緑体型のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼとの相同性は 72~73 % であったのに対し、ミトコンドリア型のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼとの相同性は 24~25 % であった (図 3-17)。


```

      10      20      30      40      50      60      70      80
GAATTCTCTGCGATTTCCATGGAGTTATCTCTCTCCGTCGACGACTCAATCGCTTCTTCCGTCGTTTTCGAAGCCCAA
      M E L S L L R P T T Q S L L P S F S K P N

      90     100     110     120     130     140     150     160
TCTCCGATTAAATGTTTATAAGCCTCTTAGACTCCGTTGTTTCAGTGGCCGGTGGACCAACCGTCGGATCTTCAAAAATCG
      L R L N V Y K P L R L R C S V A G G P T V G S S K I E

      170     180     190     200     210     220     230     240
AAGCGGAGGAGGCACCACCATCACGACGGATTGTGTGATTGTGCGGCGAGGTATTAGTGGTCTTTGCATCGCTCAGGCG
      G G G G T T I T T D C V I V G G G I S G L C I A Q A

      250     260     270     280     290     300     310     320
CTTGCTACTAAGCATCCTGATGCTGCTCCGAATTTAATTGTGACCGAGGCTAAGGATCGTGTGGAGGCAACATTATCAC
      L A T K H P D A A P N L I V T E A K D R V G G N I I T

      330     340     350     360     370     380     390     400
TCGTGAAGAGAATGGTTTTCTCTGGGAAGAAGGTCCCAATAGTTTTCAACCGTCTGATCCTATGCTCACTATGGTGGTAG
      R E E N G F L W E E G P N S F Q P S D P M L T M V V D

      410     420     430     440     450     460     470     480
ATAGTGGTTTGAAGGATGATTTGGTGTGGGAGATCCTACTGCGCCAAGGTTTGTGTTGTGGAATGGGAAATTGAGGCCG
      S G L K D D L V L G D P T A P R F V L W N G K L R P

      490     500     510     520     530     540     550     560
GTTCCATCGAAGCTAACAGACTTACCGTTCTTTGATTTGATGAGTATTGGTGGGAAGATTAGAGCTGGTTTTGGTGCAC
      V P S K L T D L P F F D L M S I G G K I R A G F G A L

      570     580     590     600     610     620     630     640
TGGCATTCGACCGTCACCTCCAGGTCGTGAAGAATCTGTGGAGGAGTTTGTACGGCGTAACCTCGGTGATGAGGTTTTTG
      G I R P S P P G R E E S V E E F V R R N L G D E V F E

      650     660     670     680     690     700     710     720
AGCGCCTGATTGAACCGTTTTGTTTCAGGTGTTTATGCTGGTGATCCTTCAAAACTGAGCATGAAAGCAGCGTTTGGGAAG
      R L I E P F C S G V Y A G D P S K L S M K A A F G K

      730     740     750     760     770     780     790     800
GTTTGGAACTAGAGCAAAATGGTGAAGCATAATAGTGGTACTTTTAAGGCAATTCAGGAGAGGAAAAACGCTCCCAA
      V W K L E Q N G G S I I G G T F K A I Q E R K N A P K

      810     820     830     840     850     860     870     880
GGCAGAACGAGACCCGCGCTGCCAAAACACAGGGCCAAACAGTTGGTTCTTTTCAGGAAGGGACTTCGAATGTTGCCAG
      A E R D P R L P K P Q G Q T V G S F R K G L R M L P E

      890     900     910     920     930     940     950     960
AAGCAATATCTGCAAGATTAGGTAGCAAAAGTTAAGTTGTCTTGAAGCTCTCAGGTATCACTAAGCTGGAGAGCGGAGGA
      A I S A R L G S K V K L S W K L S G I T K L E S G G

      970     980     990     1000     1010     1020     1030     1040
TACAACTTAACATATGAGACTCCAGATGGTTTAGTTTCCGTGCAGAGCAAAAGTGTTGTAAATGACGGTGCCATCTCATGT
      Y N L T Y E T P D G L V S V Q S K S V V M T V P S H V

```

図 3-15 pAGE17 の塩基配列と推定されるアミノ酸配列

塩基配列の左に塩基数を示した。DDBJ、EMBL、GenBank の accession number は D83139 である。

```

1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
TGCAAGTGGTCTCTTTGCGCCCTCTTTCTGAATCTGCTGCAATGCACTCTCAAACTATATTACCCACCAGTTGCAGCAG
A S G L L R P L S E S A A N A L S K L Y Y P P V A A V

1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
TATCTATCTCGTACCCGAAAGAAGCAATCCGAACAGAATGTTTGATAGATGGTGAACATAAGGGTTTTGGGCAATTGCAT
S I S Y P K E A I R T E C L I D G E L K G F G Q L H

1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
CCACGCACGCAAGGAGTTGAAACATTAGGAACATCTACAGCTCCTCACTCTTTCCAAATCGCGCACCGCCCGGAAGAAT
P R T Q G V E T L G T I Y S S S L F P N R A P P G R I

1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350      1360
TTTGCTGTTGAACTACATTGGCGGGTCTACAAACACCGGAATTCTGTCCAAGTCTGAAGGTGAGTTAGTGGAAGCAGTTG
L L L N Y I G G S T N T G I L S K S E G E L V E A V D

1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
ACAGAGATTTGAGGAAAAATGCTAATTAAGCCTAATTCGACCGATCCACTTAAATTAGGAGTTAGGGTATGGCCTCAAGCC
R D L R K M L I K P N S T D P L K L G V R V W P Q A

1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
ATTCCTCAGTTTCTAGTTGGTCACTTTGATATCCTTGACACGGCTAAATCATCTCTAACGTCTTCGGGCTACGAAGGGCT
I P Q F L V G H F D I L D T A K S S L T S S G Y E G L

1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
ATTTTTGGGTGGCAATTACGTGCTGGTGTAGCCTTAGGCCGGTGTGTAGAAGGCGCATATGAAACCGCGATTGAGGTCA
F L G G N Y V A G V A L G R C V E G A Y E T A I E V N

1610      1620      1630      1640      1650      1660
ACAACCTCATGTACGGTACGCTTACAAGTAAATGTAAAACATTAAATCTCCAGCTTGCCTG
N F M S R Y A Y K *

```

図3-15 続き

<i>A. thaliana</i>	MELSLLRPTTQSLLPSPFSKPNLRLNVYKPLRLRCSVAGGPTVGSSKIEGGGGTTITTDCCV
<i>B. subtilis</i>	-----MSDGKKHVV
human	-----MGRTVV
mouse	-----MGRTVI
<i>A. thaliana</i>	IVGGGISGLCIAQALATKHPD--AAPNLIVTEAKDRVGGNIITRE-ENGFLWEEGPNSFQ
<i>B. subtilis</i>	IIGGGITGLAAFYMEKEIKEKNLPLELTLVEASPRVGGKIQTIVK-KDEYIIERGPDSTFL
human	VLGGGISGLAASYHLIRAP----CPPKVVLVESSERLGGWIRSVRGPNGAIFELGPRGIR
mouse	VLGGGISGLAASYHLIRGP----SPPKVILVEGSKRLGGWIRSVIRGSDGATFELGPRGIR
<i>A. thaliana</i>	PS----DPMLTNAVVDSELKDDL---VLGD-PTAP-REVLWN--GKLRVPVSKLTDLPPFD
<i>B. subtilis</i>	ERK---KSAPQIVKDLGLEHLLVNNATGQSYVLVNRTHHPMPKGAVMGTPTKIAPFVSTG
human	PAGALGARTLLVSELGLDSEVLP-VRGDHPAAQNRFYVYG--GALHALPTGLRGLLRPS
mouse	PAGALGARTLLVSELGLESEVLP-VRGDHPAAQNRFYVYG--GTLHPLPQGLRGLLRPS
<i>A. thaliana</i>	LMSIGGKIRAGFGALGIRSPPPGREESVEEFVRRNLGDEVFERLIEPFCSGVYAGDPSKL
<i>B. subtilis</i>	LFSLSGKARAAMDIFILP-ASKTKDDQSLGEFFRRRVGDEVVENLIEPLLSCIYAGLIDKL
human	PPFSKPLFWAGLRELTK-PRGKEPDETIVHSFAQRRLGFEVASLAMDSLRCGVFAGNSREL
mouse	PPFSKPLFWAGLRELTK-PRGKEPDETIVHSFAQRRLGFEVASLAMDSLRCGVFAGNSREL
<i>A. thaliana</i>	SMKAAFQKVKWLEONGGSIIGTFKAIQERKNAPKAERDPRLPKPQGGTVGSFRKGLRML
<i>B. subtilis</i>	SLMSTFPQFYQTEQKHSRLILGMKTRP----QSGSQ---OLTAKKQGFQTLSTGLQTL
human	SIRSCFPSLFQAEQTHRSILLGLLLGAG-RTPQPDSS-LIRQALAERWSQWSLRGGLEML
mouse	SIRSCFPSLFQAEQTHRSILLGLLLGAG-QSPQPDSS-LIRQARAERWSQWSLRGGLEVL
<i>A. thaliana</i>	PEAISARLGSK---VKLSWKLSGITKLESGGYNLTYETPDGLVSVQSKSVMTVP SHVAS
<i>B. subtilis</i>	VEETEKQLKLT--KVYKGTVKLSSHSGS-CYSLELDN--GVTLDAADSVITAPHKAAA
human	POALETHLTSRGVSVLRGQPVCGLSLQAEGRWKVSLR--D--SSLEADHVISAI PASVLS
mouse	POALHNHLASKGVTVLSGQPVCGLSLQPEGRWKVSLG--D--SSLEADHII SAIPASELS
<i>A. thaliana</i>	GLLR--PLSESAANALSKLYPPVAAVSISYPKEAIRTECLIDGELKGFGQLHPRTQGVE
<i>B. subtilis</i>	GMLSELPAISHLKNNHMS----TSVANVALGFPEGSVOMEHEG-----TG FVISRNSDFA
human	ELLP--AEAAPLARALS-----AITAVSVAVVNLQYQGAHLP---VQGFGLHPSSSEDPG
mouse	KLLP--AEAAPLARILS-----TIKAVSVAVVNLQYRGACLP---VQGFGLHPSSSEDPT
<i>A. thaliana</i>	TLGTIYSSSLFFNR--APPGRILLNLYIGGSTNTGILSKSEGELVEAVDRDLRKMLIKPN
<i>B. subtilis</i>	ITACTWTNKKWPHA--APEGKTLRAYVGKAGDESDVLDSDNDIINIVLEDLKKVMN--I
human	VLGIVYDSVAFPEQDGSPPG-LRVTVMLGGSWLQTLTASGCVLSQELFQQRAQEA AATQL
mouse	VLGIVYDSVAFPEQDGNPPS-LRVTVMLGGYWLQKLKAAGHQLSPELFQQQAQEA AATQL
<i>A. thaliana</i>	STD--PLKLGVRVWPQAIPOFLVGHFDIILDTAKSSLTSSGYEGLFLGGNYVAGVALGRGV
<i>B. subtilis</i>	NGE--PEMTCVTRWHESMPOMHVGHKQRIKELREALASAYPG-VYMTGASFEGVGIPDCI
human	GLKEMPSHCLVHLHKNCIPQYTLGHWQKLESARQFLTAHRLP-LTLGASYESGVAVNDGI
mouse	GLKEPPSHCLVHLHKNCIPQYTLGHWQKLD SAMQFLTAQRLP-LTLGASYESGVAVNDGI
<i>A. thaliana</i>	EGAYETAIEVNNFMSRYAYK
<i>B. subtilis</i>	DQGKA AVSDALTYLFS----
human	ESGRQA AVSVLGTEPNs----
mouse	ESGRQA AVAVLGTESNS----

図 3-16 pAGE17 の塩基配列から推定されるアミノ酸一次配列と枯草菌、ヒト、マウスのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列の比較

pAGE17 の塩基配列から推定されるアミノ酸配列 (*A. thaliana*) と枯草菌 (*B. subtilis*; SWISS-PROT accession number、P32397)、ヒト (human、P50336)、マウス (mouse、P51175) のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列を比較した。全ての種において同一であるアミノ酸残基を黒で、性質が似ている残基をグレーで表した。


```

A.thaliana ct -----MELSLLRPTTQSLLEPSFKPNLRLNVYKPLRLRC
tobaco ct MTTTPIANHPNIFTHQS-----SSSP-LAFLNRTSFIPFSSISKRNsvncngwtrc
potato ct MTTTAVANHPSIFTHRSPLPSPSSSSSSSFLFLNRTNFIPYFSTSKRNsvncngwtrc
A.thaliana mt -----
tobaco mt -----
potato mt -----

A.thaliana ct SVAGGPITVGSSKIEGGGTTITTTDCVIVGGGTSGLCIAQALATKHFDAAPNLIVTEAKDR
tobaco ct SVAKDYITVPSSAVDGG--PAAELDCVIVGAGISGLCIAQVMSANYP----NLMVTEARDR
potato ct SVAKDYITVPPSEVDGN--QFPELDCVIVGAGISGLCIAKVISANYP----NLMVTEARDR
A.thaliana mt -----MASGAVADHQIEAVSGKRVAVIGAGVSGPAAAYKLKSRGL---NVTVEADCR
tobaco mt -----MAPSAGEDKH---SSAKRVAVIGAGVSGLAAAYKLKIHGL---NVTVEAECK
potato mt -----MAPSAGEKQ---NCPKRVAVIGAGVSGLAAAYKLKIHGL---NVTVEAECK

A.thaliana ct VGGNIITRENGFLWEEGENSFQPSDPMMLTMVVD--SGLKDDLVLGDEPTAPRFVLWNGKLR
tobaco ct AGGNITTVRDGYLWEEGENSFQPSDPMMLTMAVD--CGLKDDLVLGDPNAPRFVLWKGKLR
potato ct AGGNITTVRDGYLWEEGENSFQPSDPMMLTMAVD--CGLKDDLVLGDEPTAPRFVLWKGKLR
A.thaliana mt VGGKLRsvmngliwdegantmtteapevgslddlglrekooffelsohkrytarnctpv
tobaco mt AGGKLRSVSODGLIWDEGANTMTSEGDVTFILDSLGLREKOOFELSONKRYTARNCTPV
potato mt AGGKLRSLSODGLIWDEGANTMTSEGDVTFILDSLGLREKOOFELSONKRYTARNCTPT

A.thaliana ct PVPSKLTDLFFDLMSIGGKIRAGFGALGIR---PSPPGR--EESVEEFVRRNLGDEVF
tobaco ct PVPSKLTDLAFFDLMSIPGKLRAGFGAIGLR---PSPPGH--EESVEQFVRRNLGGEVF
potato ct PVPSKLTDLFFDLMSIPGKLRAGFGAIGLR---PSPPGY--EESVEQFVRRNLGAEVF
A.thaliana mt MLPTNPIELVTSSVLSTGSKFOILLEPFLWKKKSSK-VSEASAEESVSEFFORHFGQEVV
tobaco mt LLPSPIDLIKSNFLSTGSKLOMLLEPFLWKNKKLSQVSDS--HESVSGFFORHFGKEVV
potato mt LLPSPIDLIKSNFLSTGSKLOMLEPFLWKNKKLTKVSDS--HESVSGFFORHFGKEVV

A.thaliana ct ERLIEPFCSGVYACDPSKLSMKAAFGKVVWLEQNGGSIIGCTFKAIQERKNAPKAERDPR
tobaco ct ERLIEPFCSGVYACDPSKLSMKAAFGKVVWLEETGGSIIGCTFKAIKERSSTERAPRDPR
potato ct ERLIEPFCSGVYACDPSKLSMKAAFGKVVWLEOTGGSIIGCTFKAIKERSSNPKPPRDPR
A.thaliana mt DYLLDPFVGGTSAADPDLSMKHGFEDLWVVEKSFSGSIIVCAIRTKFA- AKGGKSRDTKS
tobaco mt DYLLDPFVAGTCGCDPDSLSMHHSFEDLWVLEKRFSGSVILCAIRSKLS- PKNEKKQGPPK
potato mt DYLLDPFVAGTCGCDPDSLSMHLSFEDLWVLEKRFSGSVILCAIRSKLS- PIKEKKQGPPK

```

図 3-17 pAGE17 の塩基配列から推定されるアミノ酸一次配列とタバコ、ポテトの葉緑体型およびミトコンドリア型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列の比較

pAGE17 の塩基配列から推定されるアミノ酸配列 (*A. thaliana* ct) とタバコ (tobaco)、ポテト (potato) の葉緑体型 (ct)、ミトコンドリア型 (mt) の 2 種類のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、PCT に登録されているシロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (*A. thaliana* mt) のアミノ酸配列を比較した。pAGE17 の塩基配列から推定されるアミノ酸配列と葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列の間で保存されている残基をうすいグレーで、ミトコンドリア型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼで保存されている残基を濃いグレーで示し、すべてのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼで保存されている残基を黒で表した。GenBank accession number は次の通り：tobaco.ct、Y13465；potato.ct、AJ225107；tobaco.mt、Y13466；potato.mt、AJ225108。*A. thaliana* mt の特許登録番号は PCT/US97/03343。

```

A.thaliana ct  LPKPGQTVG--SFRKGLRMLPEAISARLG-SKVKLSWKLSGITKLESG-----GYNLTY
tobaco ct      LPKPKGQTVG--SFRKGLRMLPD AISARLG-SKLKLSWKLSSITKSEKG-----GYHLTY
potato ct      LETPKGQTVG--SFRKGLRMLPD AICERLG-SKVKLSWKLSSITKSEKG-----GYLLTY
A.thaliana mt  SPGTKIGSRGSFSFKGGMOTLPDTLCKSLSHDEINLDSKVLSLSYNSGSRQENWLSLSCVS
tobaco mt      TSANIKRQRGSFSFLLGGMOTLTDAICKDLREDELRLNSRVLELSCSCTEDSAIDSWSIIS
potato mt      TSVNKKRQRGSFSFLLGGMOTLTDAICKDLKEDELRLNSRVLELSCSCSGDSAIDSWSIIS

A.thaliana ct  ETPDGLVSVQS--KSVVMTVP--SHVASGLLRPLSESAANALSCLYYPVVAAVSISYPKE
tobaco ct      ETPEGVVSLQS--RSIVMTVP--SYVASNILRPLSVAADALSNFYYPVPGAVTITYPQE
potato ct      ETPEGVVSLRS--RSIVMTVP--SYVASNILRPLSVAADALSSFYYPVVAAVTISYPQE
A.thaliana mt  HNETQRONPHY--DAVIMTAPLCNVHEMVMGGQPFQLNFIPINYMPLSVLETPFKKE
tobaco mt      ASPHKRCSEESFDAVIMTAPLCDVKSMTIAKRCNPFLNFIPEVDYVPLSVVITTFKRE
potato mt      ASPHKRCSEESFDAVIMTAPLCDVKSMTIAKRCNPFLNFIPEVDYVPLSVVITTFKKE

A.thaliana ct  AIRTECLIDGELKGFGOLHP--RTO--GVETLGTIYSSSLFPNRAFPGRILLNLYIGGSTN
tobaco ct      AIRDERLVDGELKGFGOLHP--RTO--GVETLGTIYSSSLFPNRAFPGRVLLNLYIGGAKN
potato ct      AIRDERLVDGELKGFGOLHP--RTO--GVETLGTIYSSSLFPNRAFPGRVLLNLYIGGATN
A.thaliana mt  KVKRP-----LEGFGVLIPSKQKHGFKTLGTLFSSMMFPDRSPDVHLYTTEIGGSRN
tobaco mt      NVKYP-----LEGFGVLIPSKQKHGFKTLGTLFSSMMFPDRAPNNVLYTTEVGGSRN
potato mt      SVKHP-----LEGFGVLIPSKQKHGFKTLGTLFSSMMFPDRAPNNVLYTTEVGGSRN

A.thaliana ct  TGILSKSEGELVEAVDRDLRKMLIKPNSTDELKLGVRVWPCAIPOFLVGHFDIILDTAKSS
tobaco ct      PEILSKTESQLVEVDRDLRKMLIKPKAQDFLVVGVRVWPCAIPOFLVGHLDTLSTAKAA
potato ct      TEIVSKTESQLVEAVDRDLRKMLIKPKAQDFVTGVRVWPCAIPOFLVGHLDTLGTAKTA
A.thaliana mt  QELAKASTDELKQVVTSDLQRLLGVEG--EPVSVNHYWYWKAFP--LYDSSYDSVMEID
tobaco mt      RELAKASRTELKEIVTSDLQRLIGAEG--EPTYVNHLYWYWKAFP--LYGHNYDSVLDAID
potato mt      RELAKA-----

A.thaliana ct  LTSSGYEGLFLGGNYVACVALGRCVEGAYETAIEVNNFMSRYAYK-----
tobaco ct      MNDNGLEGLFLGGNYVSCVALGRCVEGAYEVASEVTGFLSRYAYK-----
potato ct      LSDNGLDGLFLGGNYVSCVALGRCVEGAYEIASEVTGFLSOYAYK-----
A.thaliana mt  KMENDLPGLFYAGNHRGGLSVGKSIASGCKAADLVISYLESCSNKKPNDSL
tobaco mt      KMEKNLPGLFYAGNHRGGLSVGKSISSGCKAADLVISYLESVSTDSKRHC---
potato mt

```

図 3-17 続き

3-2-4. *in vitro* でのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子の発現

λ gt11AGE17 の挿入断片を含む約 2.0 kb の *Bsi*WI 切断断片を平滑末端化し、プラスミドベクター Bluescript(KS⁺) (Sambrook *et al.*, 1989) の *Sma*I 部位にクローン化した。得られたクローンのうち、プロトポルフィリノーゲンをコードすると推定される ORF が Bluescript(KS⁺) の T7 RNA ポリメラーゼのプロモーターに対して順方向に挿入されたクローンを pBAGE177、逆方向に挿入されたクローンを pBAGE173 とした (図 3-18)。

これら 2 つのクローンを用い、Bluescript(KS⁺)にある T7 RNA ポリメラーゼのプロモーターを利用して *in vitro* で mRNA を合成し、ウサギ網状赤血球抽出液中で翻訳して SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。その結果、pBAGE177 由来の mRNA 翻訳産物から約 58 kD と 55 kD 付近にバンドが現れた (図 3-19)。

3-2-5. サザンブロッティングによる解析

シロイヌナズナから抽出したゲノム DNA を *Bam*HI、*Hind*III、*Eco*RI で切断して 0.7 % アガロースで電気泳動し、ニトロセルロースのメンブレンにサザンブロッティングしたものに対して、pAGE17 の挿入配列の一部である 1318 bp の *Eco*RI 切断断片を [³²P]でラベルしてハイブリッド形成させた。その結果、どの制限酵素で切断した場合も 1 つの切断断片にハイブリッド形成したバンドがみられた (図 3-20)。

3-2-6. シロイヌナズナでの発現パターンの解析

シロイヌナズナの根、葉、花芽の組織から抽出したポリ A を含む RNA を 0.7 % アガロースで電気泳動し、ニトロセルロースのメンブレンにノーザンブロッティングしたものに対して、pAGE17 の挿入配列の一部である 1318 bp の *Eco*RI 切断断片を [³²P]でラベルしてハイブリッド形成させた。どの組織から抽出した mRNA から約 1.5 kb の長さにシグナルを検出したが、ハイブリッド形成のシグナルの強さは葉で強かったのに対して、根と花芽では非常に弱いことがわかった (図 3-21)。

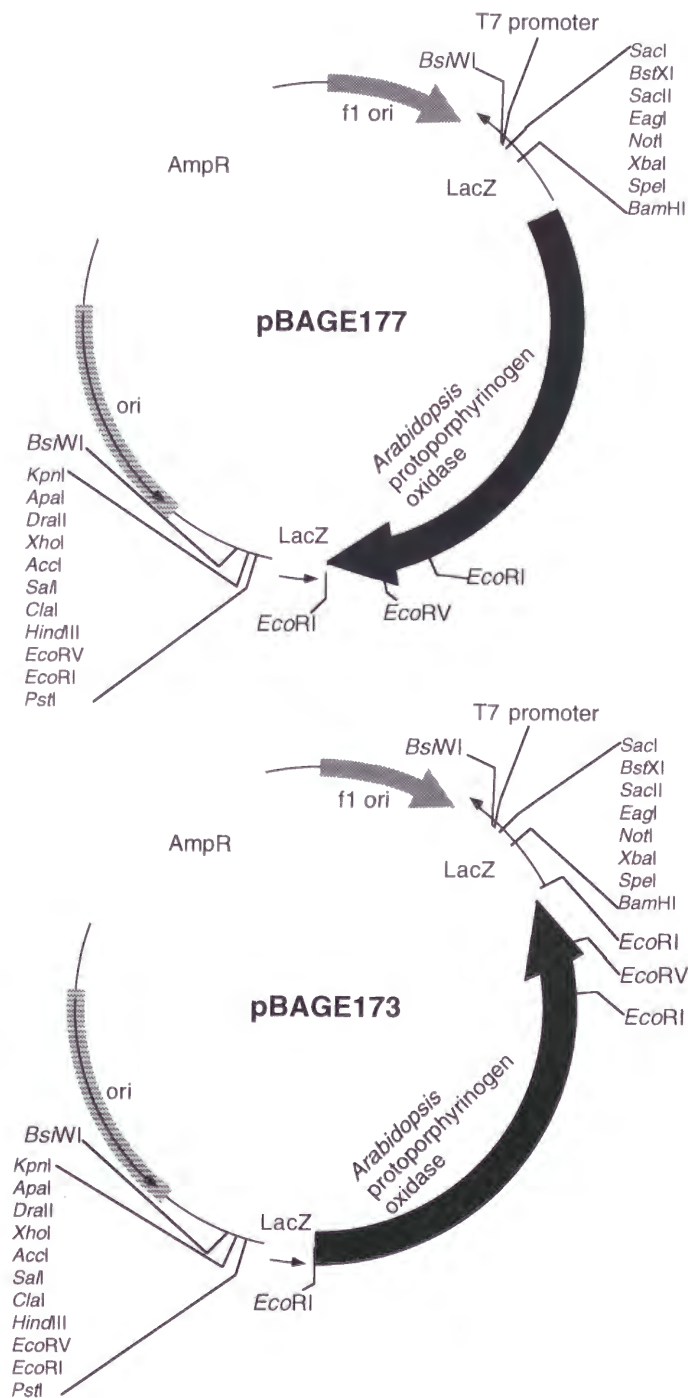


図 3-18 pBAGE177 及び pBAGE173 の制限酵素地図

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードすると考えられる cDNA は T7 プロモーターに対して pBAGE177 では順向きに、pBAGE173 では逆向きにクローン化されている。

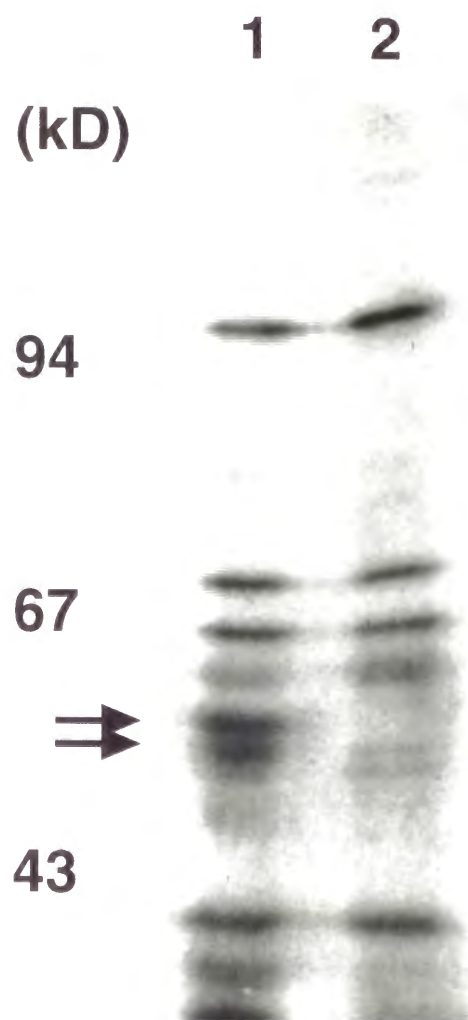


図 3-19 pBAGE177 及び pBAGE173 の *in vitro* での転写－翻訳実験

pBAGE177（レーン 1）及び pBAGE173（レーン 2）を *in vitro* で転写、翻訳し、SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後ストレプトアビジン-HRP と化学発光試薬を用いて X 線フィルム上で可視化した。レーン 1 のみで検出されるバンドに矢印を付した。

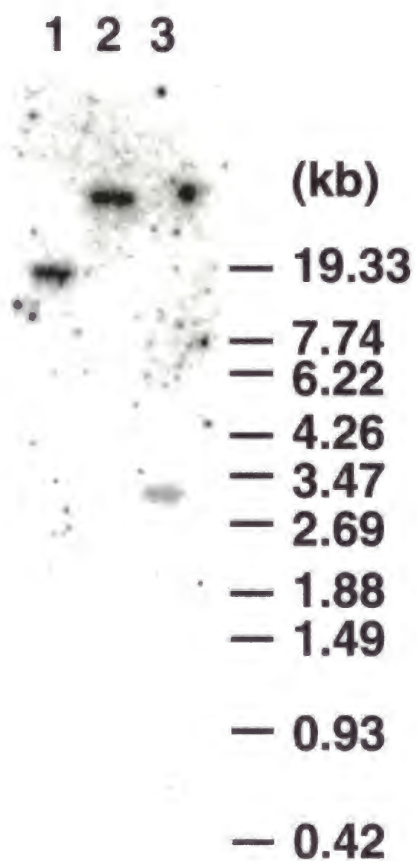


図 3-20 シロイヌナズナプロトポルフィリノーゲン遺伝子のサザンブロッティングによる解析

pAGE17 の 1318 bp の *Eco*RI 断片を [32 P]を用いてラベルしたものをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。シロイヌナズナゲノムは *Bam*HI (レーン 1)、*Hind*III (レーン 2)、*Eco*RI (レーン 3) で消化してある。

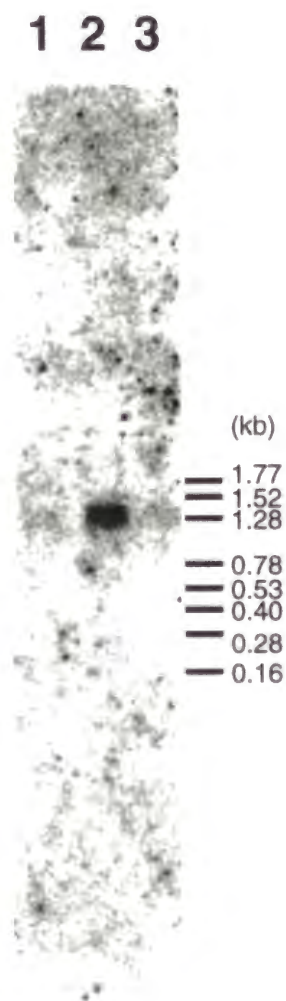


図 3-21 ノーザンブロッティングによるシロイヌナズナプロトポルフィリノーゲン
オキシダーゼ遺伝子の発現パターンの解析

pAGE17 の 1318 bp の *Eco*RI 断片を [32 P]を用いてラベルしたものをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。mRNA を抽出した組織は、根（レーン 1）、葉（レーン 2）、花芽（レーン 3）である。

第3節 大腸菌 *hemK* 遺伝子の機能

3-3-1. 大腸菌 *hemK* 遺伝子欠失変異株の解析

大腸菌 *hemK* 遺伝子とその近傍をクローン化したプラスミド (pΔSal) の *hemK* 遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子で置換し、pΔ*hemK* を作製した。続いて pΔ*hemK* の挿入断片を大腸菌 JC7623 に導入し、細胞内での相同組替えによって生じた *hemK* 遺伝子欠失変異株 JK783 を得た。JK783 と、JK783 から P1 形質導入により *hemK* 遺伝子欠失変異を LE392 に導入した LK783 は、LB 寒天培地上で小さいコロニーを形成し、液体培地での増殖も悪かった (図 3-22)。 *hemK* 遺伝子のみを含むプラスミド (p*hemK*) を導入すると、これらの *hemK* 遺伝子欠失変異株の増殖は回復した (図 3-22)。ALA を液体培地に加えて LK783 の増殖を測定したところ、増殖の回復はみられなかった。

LK783 細胞内でのポルフィリン蓄積量を測定したところ、LG285 細胞内レベルと同等、LE392 細胞内レベルの約 10^2 倍のポルフィリン類の蓄積がみられた (図 3-23)。

ヘム酸化物の透過性に関与する変異型 *yedD* 遺伝子 (21 頁参照) を LK783 に導入し、ヘム酸化物を加えた液体培地中で培養したが、増殖は回復しなかった。

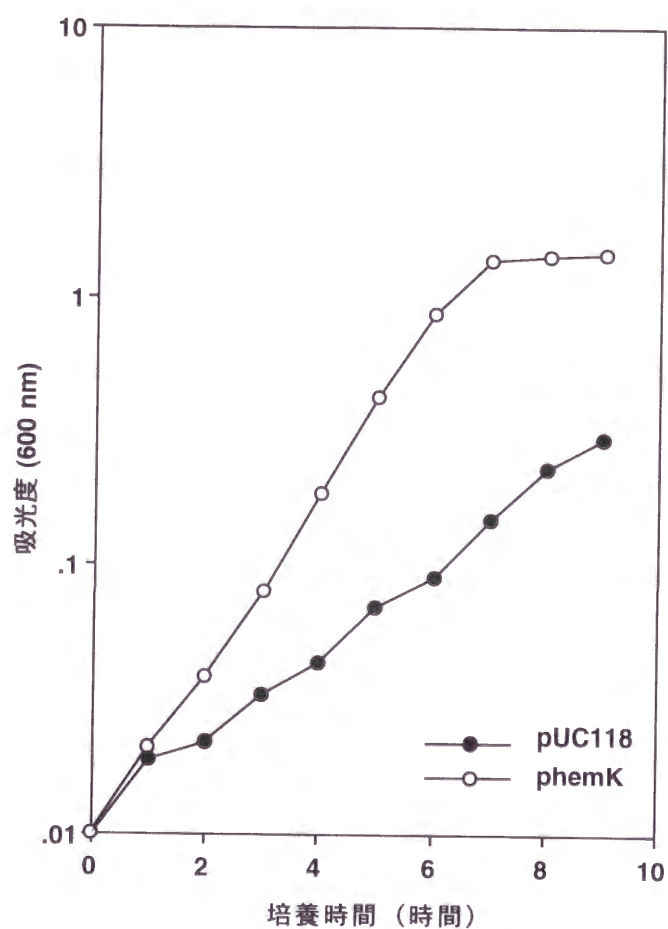


図 3-22 *hemK* 遺伝子欠失変異株の増殖

LK783 に pUC118、phemK を導入し、アンピシリンを含む LB 液体培地中で振盪培養した。

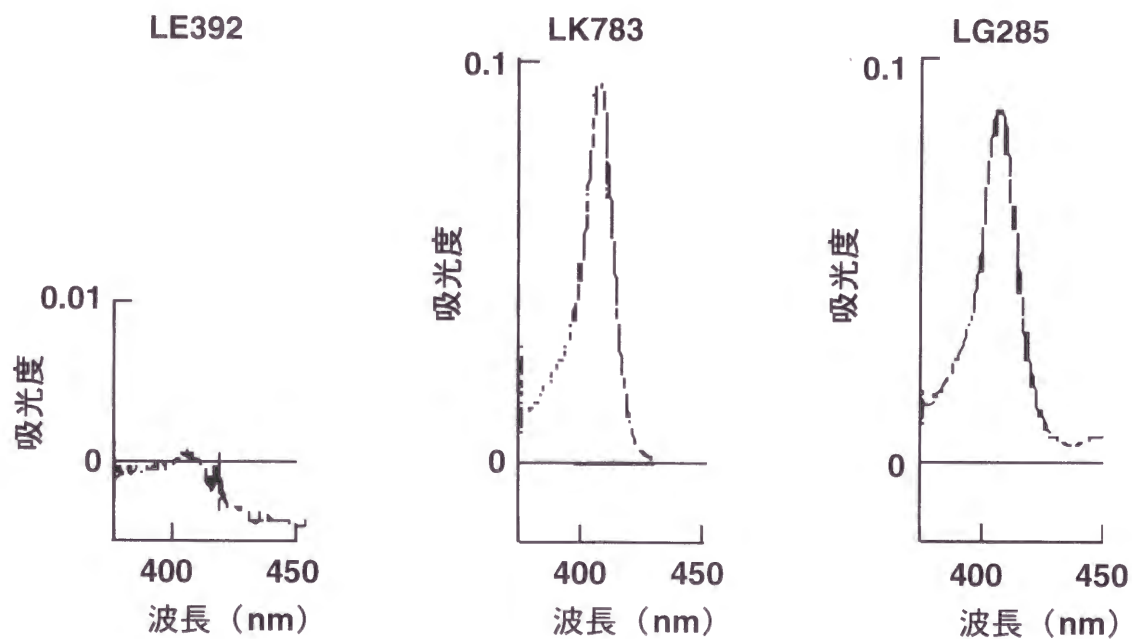


図 3-23 LK783 細胞内のポルフィリンの蓄積

LE392、LK783、LG285 を暗所で一夜培養し、細胞内に蓄積したポルフィリン量を測定した。菌数を補正するために 600 nm における吸光度 (OD600) を測定し、 $OD600 = 2.0$ となるように濃縮し、各サンプルの 1 ml を測定に用いた。

3-3-2. *hemK* 遺伝子欠失変異株からの復帰変異株の分離と変異遺伝子の同定

LK783 を変異原処理することにより、増殖が回復した復帰変異株を独立に 2 株分離し、それぞれ LLR201、HLR201 と命名した (図 3-24)。

これらの復帰変異株の変異遺伝子を同定するために、LLR201、HLR201 のゲノムライブラリーを作製し LK783 に導入した。LB 寒天培地上でアンピシリン耐性になった約 10^4 の形質転換体のうち、サイズが大きくなったコロニーを各ライブラリーから 3 個ずつ選択した。これらの形質転換株からプラスミド DNA を分離し、再び LK783 に導入して増殖を回復させることを確認した。クローンごとに挿入断片の塩基配列の一部を決定し、DNA データベースに対して相同性検索を行った結果、すべてのクローンが大腸菌染色体上の同一の領域をクローン化したものであることがわかった。クローン化されていた領域は大腸菌染色体上約 65 分に存在する 3.2 kb の *EcoRI* 切断断片であり (図 3-25)、*prfB* 遺伝子 (Caskey *et al.*, 1984a) 及び *recJ* 遺伝子 (Lovett and Kolodner, 1989) がこの中に含まれていた。LLR201 由来の挿入断片を *PvuII* 部位で切断し、それぞれを pUC118 にクローン化して LK783 に導入したところ、ペプチド鎖解離因子 2 (RF-2) をコードする *prfB* 遺伝子を含むクローン (pRRB) だけが増殖を回復させることがわかった。同じ領域を LE392 ゲノム DNA から PCR 法を用いて増幅し、pUC118 にクローン化したプラスミド (pLRB) は、LK783 の増殖を回復させなかった (図 3-26)。

pRRB、pLRB、さらに HLR201 の *prfB* 遺伝子を含むクローンについて、挿入断片の全塩基配列を決定した。LLR201 由来のクローンと HLR201 由来のクローンの配列は同一で、LE392 の *prfB* 遺伝子の塩基配列と比較すると翻訳開始点から 735 残基目のアデニンがシトシンに変わっていた。報告されている大腸菌野生型 *prfB* 遺伝子 (Craigien *et al.*, 1985) では 601 残基目はグアニンであるのに対し、LLR201、HLR201、LE392 の *prfB* 遺伝子ではこの塩基はシトシンであった (図 3-27)。Wu ら (Wu *et al.*, 1990) は大腸菌 LS653 (Soll and Berg, 1974) 由来の *prfB* 遺伝子の塩基配列を決定し、601 残基目の塩基がシトシンであることを報告しており、この残基が大腸菌株の間で保存されていない可能性を示唆した。このため、LLR201 と HLR201 において変異の起こった部位は *prfB* 遺伝子の 735 残基目であり、このアデニンからシトシンへの塩基置換 (transversion) によってアミノ酸レベルでは RF-2 の 246 残基目のスレオニンがアラニンに置換していると推定した。

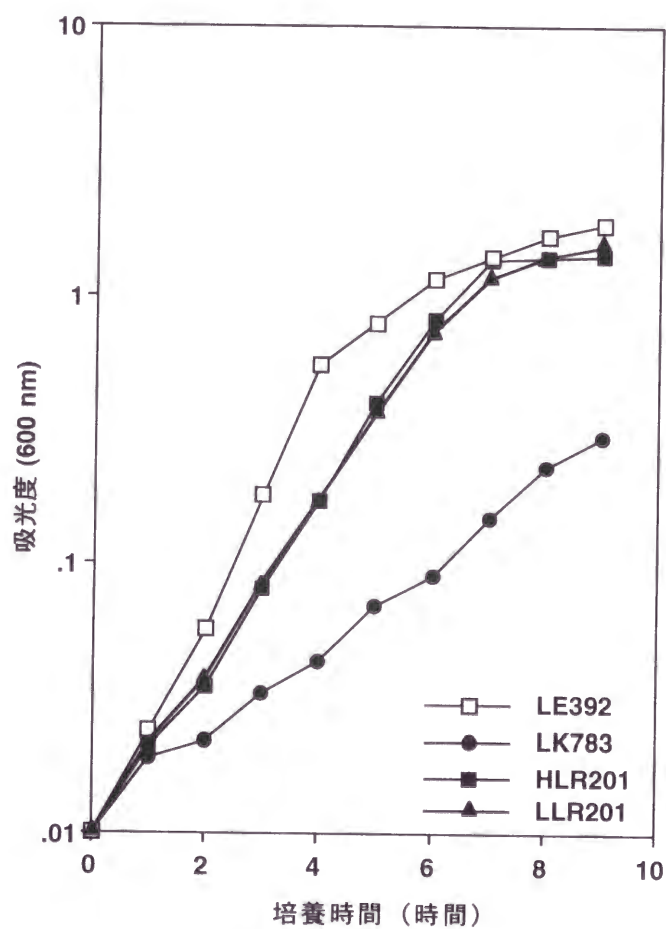


図 3-24 LK783 から分離した復帰変異株の増殖

LB 液体培地中での各大腸菌の増殖を測定した。

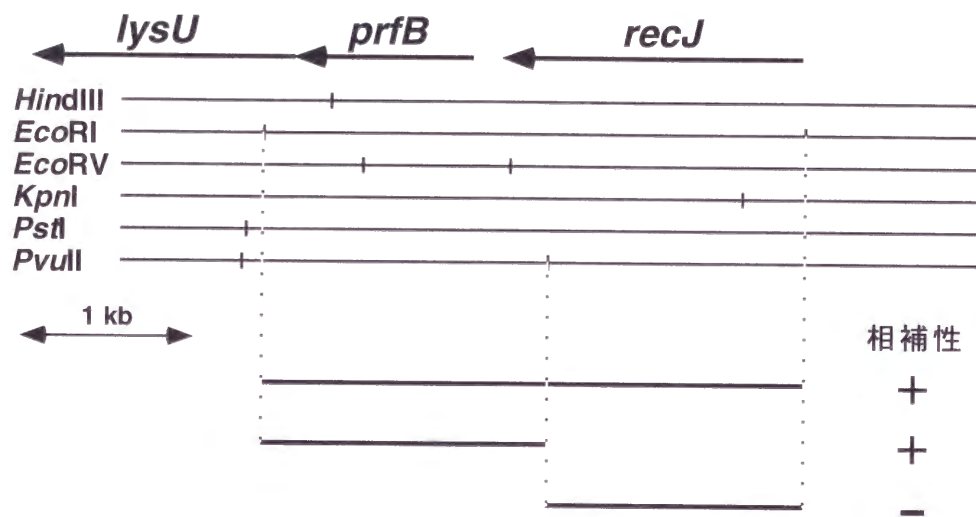


図 3-25 LK783 からの復帰変異株における変異遺伝子

prfB 遺伝子付近の制限酵素地図と LK783 を相補する LLR201 由来のゲノム領域を示した。

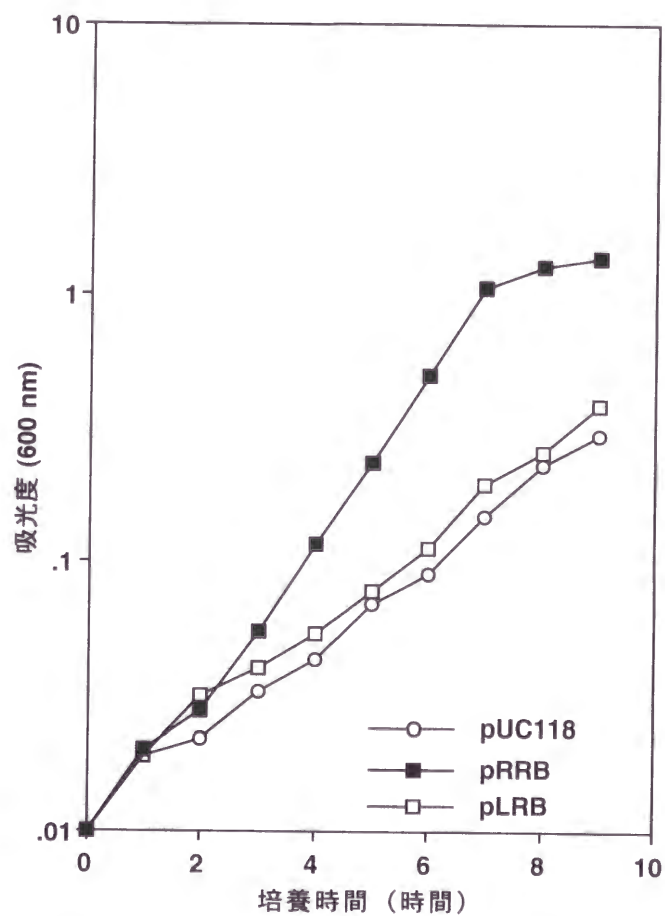


図 3-26 pRRB の導入による LK783 の相補

LK783 に pUC118、pRRB、pLRB を導入し、アンピシリンを加えた LB 液体培地中での増殖を測定した。

```

10      20      30      40      50      60      70      80
acagcggctgggtggcggaacgtcatttgaaggtgatggtcgaaccggtcggcggcggtccactgctggatggtattgctt

90      100     110     120     130     140     150     160
ttaatgtcgataccgccctctggccggataaacggcgtgcgcgaagtgcactggttataagctcgatatcaacgagttt

170     180     190     200     210     220     230     240
cgccggaaccgcagcctgcaaattatcatcgacaatatctggccaatttagcgtcatcttctctataaaaaagagcgtgg

250     260     270     280     290     300     310     320
attgggtacaatcccgcgtcttatcaccgcattttgactagctcaataaaagaaatcagaccatgtttgaaattaatccgg
                                     M F E I N P V

330     340     350     360     370     380     390     400
taaataatcgcatcaggacctcacggaacgctccgacgttcttaggggtatctttgactacgacgccaagaaagagcg
N N R I Q D L T E R S D V L R G Y L D Y D A K K E R

410     420     430     440     450     460     470     480
tctggaagaagtaaaccgagcgtggaacagccggtatgctggaacgaaccggaacgcgcacaggcgtgggtaagagc
L E E V N A E L E Q P D V W N E P E R A Q A L G K E R

490     500     510     520     530     540     550     560
gttcctccctcgaagcgttgcgacacctcgaccaaataaacaggggctggaagatgtttctggtctgctggaactg
S S L E A V V D T L D Q M K Q G L E D V S G L L E L

570     580     590     600     610     620     630     640
gctgtagaagctgacgacgaagaaacctttaacgaagcgttgcgtaactcgacgcctggaagaaaaactggcgacgt
A V E A D D E E T F N E A V A E L D A L E E K L A Q L

650     660     670     680     690     700     710     720
tgagttccgcgtatgttctctggcgaatatgacagcgccgactgctacctcgatattcaggggggctctggcggtacgg
E F R R M F S G E Y D S A D C Y L D I Q A G S G G T E

730     740     750     760     770     780     790     800
aagcacaggactggcgagcatgcttgagcgtatgtatctgcgctgggcagaatcgctgggtttcaaaactgaaatcatc
A Q D W A S M L E R M Y L R W A E S R G F K T E I I

810     820     830     840     850     860     870     880
gaagagtcggaaggtgaagtggcggtattaaatccgtgacgatcaaatctccggcgattacgcttacggtggctgcg
E E S E G E V A G I K S V T I K I S G D Y A Y G W L R

890     900     910     920     930     940     950     960
tacagaaaccggcgttcaccgcttggtgcgtaaaagccggttgactccggcggtcgctgccacacgctgcttcagctccg
T E T G V H R V R K S P F D S G G R R H T S F S S A

970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040
cgttgtttatccggaagtgtgatgatattgatatcgaaatcaaccggcggtatctgcgcattgacgtttatcgctccg
F V Y P E V D D D I D I E I N P A D L R I D V Y R

1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
tccggcgcgggcggtcagcacgttaaccgtaccgaatctgcgggtgcgtattacccacatcccgaccggggtcgtgacca
S G A G G Q H V N R T E S A V R I T H I P T G I V T Q

1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
gtgccagaacgacggttccagcacaagaacaagatcaggccatgaagcagatgaaagcgaagctttatgaactggaga
C Q N D R S Q H K N K D Q A M K Q M K A K L Y E L E M

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280
tgcagaagaaaaatgccgagaaacaggcgatggaagataacaaatccgacatcggtggggcagccagattcgttcttat
Q K K N A E K Q A M E D N K S D I G W G S Q I R S Y

1290    1300    1310    1320    1330    1340    1350    1360
gtccttgatgactcccgcatcattaaagatctgcgcaccgggtagaaacccgcaacacgcagggcgtgctggacggcagcct
V L D D S R I K D L R T G V E T R N T Q A V L D G S L

1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430    1440
ggatcaatttatcgaagcaagtttgaaagcaggggttatgaggaaccaatatgtctgaacaacacgaaaaaaaaaaaaaa
D Q F I E A S L K A G L *

1450
a

```

図 3-27 *prfB* 遺伝子の塩基配列、アミノ酸配列と
復帰変異株において変異の起きた部位

LLR201 由来の *prfB* 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列を示した。Craigen ら (Craigen *et al.*, 1985) が報告した残基と異なる残基は黒で表した。

3-3-3. 復帰変異株 LLR201 由来 RF-2 のペプチド鎖解離活性

宇野ら (Uno *et al.*, 1996) は大腸菌 RF-2 とサルモネラ菌 RF-2 のペプチド鎖解離活性を解析し、RF-2 の 246 残基目のアミノ酸が UAA コドンの認識に重要であることを示した。このため、*hemK* 遺伝子欠失変異株からの復帰変異株においても RF-2 のペプチド鎖解離活性が変化していると考えられたので、LLR201 由来の RF-2 のペプチド鎖解離活性を測定した。大腸菌 CA274 (Russell *et al.*, 1970)、CA293、LS653 は *lacZ* 遺伝子中にそれぞれアンバー (UAG)、オーカー (UAA)、オパール (UGA) のナンセンスコドンを持つ変異株である。ナンセンスコドンにおいてペプチド鎖解離因子により翻訳終結が行われなければ (translational read through)、*lacZ* 遺伝子は全長にわたって翻訳されるため、その頻度はβ-ガラクトシダーゼ活性を測定することによって検出できる。CA274、CA293、LS653 に LLR201 由来の *prfB* 遺伝子をクローン化したプラスミド (pRRB)、LE392 由来の *prfB* 遺伝子をクローン化したプラスミド (pLRB)、挿入断片の入っていない pUC118 をそれぞれ導入し、各形質転換株を用いてβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。pRRB の導入によって CA293 と LS653 のβ-ガラクトシダーゼ活性は低下したことから (表 3-3)、LLR201 の RF-2 は UAA コドン及び UGA コドンにおけるペプチド鎖解離活性が上昇していることがわかった。また、pRRB を導入した CA274 のβ-ガラクトシダーゼ活性は pUC118 や pLRB を導入したものと比較して上昇していた。

上記のようなペプチド鎖解離活性を示す変異型 RF-2 が *hemK* 遺伝子欠失変異をサプレスすることから、*hemK* 遺伝子欠失変異株におけるペプチド鎖解離活性の影響を解析した。*hemK* 遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子に置換したところ、CA274 と LS653 ではβ-ガラクトシダーゼ活性に顕著な影響はみられなかったのに対し、CA293 のβ-ガラクトシダーゼ活性は 2.4 倍上昇した (表 3-4)。この結果により、*hemK* 遺伝子欠失変異株では UAA コドンにおけるペプチド鎖解離活性が低下していることが明らかになった。

表 3-3 LLR201 由来 RF-2 のペプチド鎖解離活性

菌株	<i>lacZ</i> 遺伝子内の ナンセンスコドン	β -ガラクトシダーゼ活性 ¹		
		pUC118	pLRB	pRRB
CA274	UAG	4.2	2.7	14.0
CA293	UAA	1.1	1.2	< 0.1
LS653	UGA	22.8	25.7	0.6

¹ β -ガラクトシダーゼ活性は Miller の定義によるユニット (Miller, 1972) で表した。

表 3-4 *hemK* 遺伝子欠失変異がペプチド鎖解離活性に及ぼす影響¹

菌株	<i>lacZ</i> 遺伝子内の ナンセンスコドン	β-ガラクトシダーゼ活性 ²	
		<i>hemK</i> :野生型	<i>hemK</i> ::Cm ^{r3}
CA274	UAG	4.2	4.1
CA293	UAA	3.6	8.8
LS653	UGA	18.2	15.8

¹ CA274、CA293、LS653 について、*hemK* 遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子で置き換えた株それぞれ作製し、置換していない株と比較した。β-ガラクトシダーゼ活性の測定には LB 液体培地中での一夜培養液を用いた。

² β-ガラクトシダーゼ活性は Miller の定義によるユニット (Miller, 1972) で表した。

³ Cm^r、クロラムフェニコール耐性。

3-3-4. *hemK* 遺伝子欠失変異株における *hemA-prfA-hemK* オペロンの プロモーター活性

大腸菌では UAA コドンは主に RF-1 によって認識される (Rydén and Isaksson, 1984; Kawakami *et al.*, 1988) ことから、大腸菌 *hemK* 遺伝子欠失変異株では RF-1 の UAA コドンにおけるペプチド鎖解離活性の低下が原因となり増殖が悪化していることが考えられた。RF-1 をコードする *prfA* 遺伝子は *hemA-prfA-hemK* オペロンを形成し (図 3-28)、*hemA* 遺伝子上流領域に存在するプロモーターから *hemK* 遺伝子とともに転写される (Elliott, 1989)。このため、*hemK* 遺伝子欠失変異により *prfA* 遺伝子の転写レベルが低下し、RF-1 のペプチド鎖解離活性が低下していると予想し、*hemK* 遺伝子欠失変異株における *hemA* プロモーターの活性を測定した。*hemA-lacZ* 融合遺伝子の発現は、CA293 の *hemK* 遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子で置換した株 (CK783) では 10 分の 1 に低下した (表 3-5)。これに対し、ALA 脱水素酵素をコードする *hemB* 遺伝子のプロモーター活性は *hemK* 遺伝子欠失変異の影響を受けなかった (表 3-5)。

hemA プロモーター活性の低下により *hemK* 欠失変異株では *prfA* 遺伝子の転写レベルが低下していることが考えられたので、*prfA* 遺伝子のコーディング領域を pMW118 の *lacZ* プロモーターの下流にクローン化したプラスミドクローン (pprfA) を作製し、LK783 に導入して増殖を測定した。図 3-29 に示したように、LK783 の増殖は pprfA の導入によって回復した。

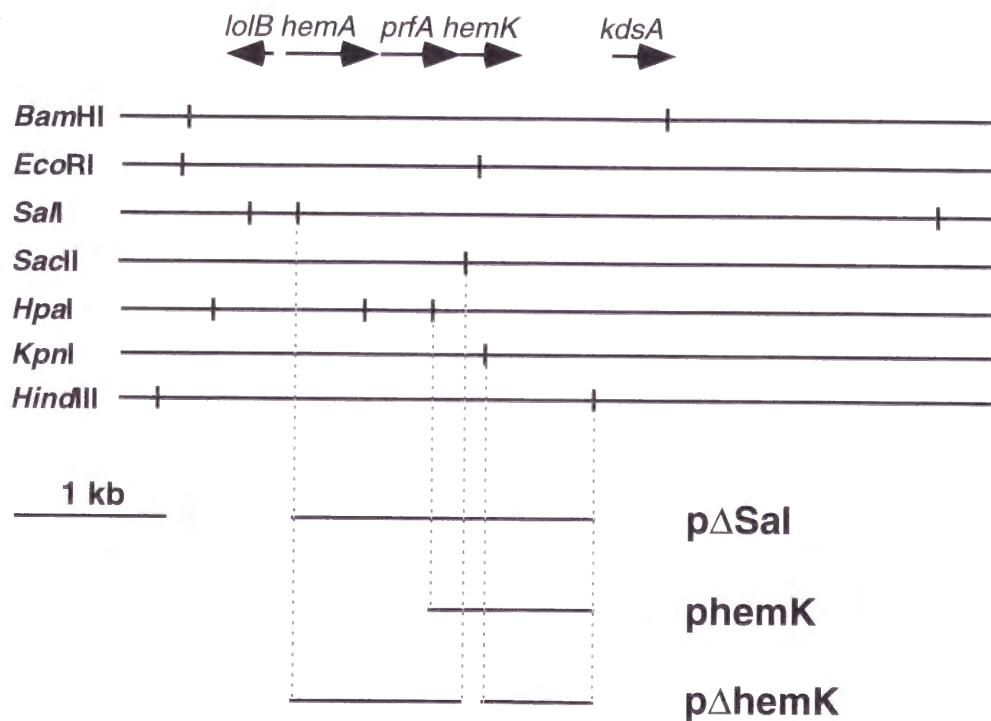


図 3-28 *hemA-prfA-hemK* オペロン付近の物理的地図

hemA-prfA-hemK オペロン付近の制限酵素地図と本研究で用いた代表的なクローンの挿入断片を示した。なお、*lolB* はリボタンパク質の局在に関わる膜タンパク質をコードし (Matsuyama *et al.*, 1997)、*kdsA* はリボ多糖の生合成に関わる酵素 (2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase) をコードする遺伝子である (Woiseschlager and Hogenauer, 1987)。

表 3-5 *hemK* 遺伝子欠失株における *hemA* プロモーター活性

菌株 ¹	<i>hemK</i> の遺伝型	β-ガラクトシダーゼ活性 ²	
		<i>hemA-lacZ</i>	<i>hemB-lacZ</i>
CA293	野生型	2900	310
CK783	<i>hemK::Cm^r</i> ³	280	410

¹CA293 と CK783 の増殖条件を近づけるために双方の菌株に pRRB を導入し、50 μg / ml のアンピシリンを含む LB 液体培地中で 600 nm での吸光度が 0.35～0.5 になるまで培養した。

²β-ガラクトシダーゼ活性は Miller の定義によるユニット (Miller, 1972) で表した。

³Cm^r、クロラムフェニコール耐性。

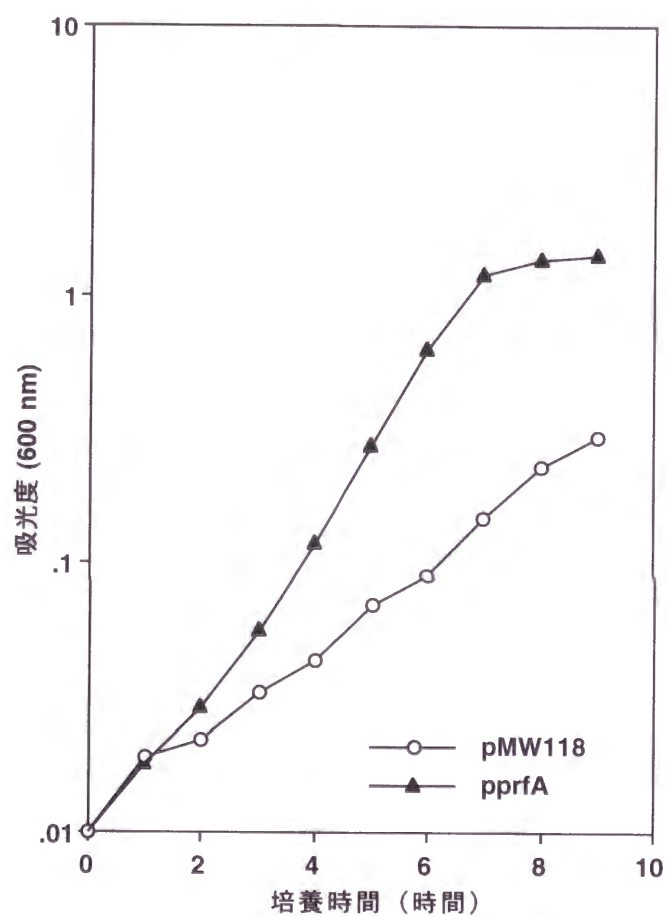


図 3-29 pprfA による LK783 の相補

LK783 に pMW118、pprfA を導入し、アンピシリンを含む LB 液体培地中での増殖を測定した。

第4章 考察

第1節 酸素依存型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性

大腸菌 *hemG* 遺伝子欠失変異株 LG285 は VSR800 などの *hemG* 遺伝子変異株と同様に増殖が悪く、*hemG* 遺伝子のみを含む λ ファージクローン (λ_{gxx1}) や培地中に加えたヘム酸化物によって増殖が回復した。このため LG285 の増殖阻害は *hemG* 遺伝子の欠失変異が原因となりヘムが合成できなくなったためであることがわかった。ヘムを欠損する大腸菌株ではチトクロムなどのヘムを含む酵素が合成できないために呼吸能を欠くため、これが LG285 の増殖阻害の主な原因であると考えられる。

hemG 遺伝子変異株を変異原処理することによって、増殖が回復した復帰変異株を分離した。復帰変異株における変異として、次の5種類の変異を想定した。本節ではそれぞれの可能性について考察する。1) *hemG* 遺伝子の復帰変異；2) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ複合体を構成する他のサブユニットの変異；3) 他の酸化酵素の変異；4) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を持つ酵素の発現量の上昇；5) 偽遺伝子 (pseudogene) の復帰変異。

1) *hemG* 遺伝子の復帰変異：VSR800 などの *hemG* 遺伝子変異株では、変異部位において再び変異が起こった結果、野生型 *hemG* 遺伝子に復帰する場合と、*hemG* 遺伝子内に第2の変異が起こった結果、遺伝子内サプレッションによって *hemG* 遺伝子産物が活性を獲得する場合が考えられる。しかし、LG285 の作製にあたっては *hemG* 遺伝子の一部を完全に欠失させたので、*hemG* 遺伝子の機能が回復した復帰変異株が生じる可能性は除外できる。従って、N11、N13、N17 では *hemG* 遺伝子産物以外の因子によってプロトポルフィリノーゲン IX の酸化が触媒されていることが考えられる。

2) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ複合体を構成する他のサブユニットの変異：酸素非依存型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは *Desulfovibrio gigas* から精製され、3つのサブユニットから構成されていることがわかっている (Klemm and Barton, 1987)。大腸菌のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼも酸素非依存的に機能することから、*hemG* 遺伝子はプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ複合体のサブユニットの1つをコードすると考えられる。*hemG* 遺伝子によってコードされるタンパク質の推定される分子量 21 kDa は *D. gigas* のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのサブユニットの1つ (18 kDa) に近い (Sasarman *et al.*, 1993)。残りの2つのサブユニットに変異が起こることによって *hemG* 遺伝子産物を介さずにプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ複合体が活性を示すようになる場合が想定できる。この場合、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは嫌氣的条件下でも機能することが予想されるが、図 3-1 に示したように、大腸菌

野生型の *hemG* 遺伝子によってコードされるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは酸素に依存せずに働くのに対し、N11、N13、N17 の増殖回復は全て酸素依存的であった。これらの復帰変異株の嫌気的条件下での増殖は、*λgxx1* によって相補されたことから、N11、N13、N17 では酸素依存型のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼが機能し、好気的条件下でのみ増殖を回復させていることがわかった。したがって、分子状酸素を電子受容体として利用してプロトポルフィリノーゲン IX の酸化を行う、真核生物型のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのような酵素活性が考えられる。

3) 他の酸化酵素の変異：ペルオキシダーゼなどの他の酵素に変異が起こることによってプロトポルフィリノーゲン IX を認識し酸化する場合が考えられる。*in vitro* ではペルオキシダーゼがポルフィリノーゲンを酸化することが知られており (Yamato *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1996)、何らかの変異によってこれらの酵素が *in vivo* でプロトポルフィリノーゲン IX を酸化できるようになる可能性が考えられる。この場合、変異型酵素をコードする遺伝子をクローン化し LG285 に導入することによって増殖が回復することが期待される。

4) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を持つ酵素の発現量の上昇：プロトポルフィリン IX は光増感剤であり、光によって励起され活性酸素種を発生する (Ito and Ito, 1988)。このため細胞内のプロトポルフィリン IX の蓄積量は抑えられていると考えられる。従ってプロトポルフィリノーゲン IX をプロトポルフィリン IX に変換する活性は抑制されていることが予想されるが、この抑制が解除された変異株では *hemG* 遺伝子産物を介さずにプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を示す酵素が機能することが考えられる。抑制解除には、転写抑制因子の失活などによる劣性変異や、プロモーターの変異による過剰発現化などによる優性変異が要因となり得る。

5) 偽遺伝子の復帰変異：プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼには酸素依存型と酸素非依存型の2種類の酵素が存在し、生物種によって異なる。コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼも同様に酸素依存型と酸素非依存型の酵素が存在し、生物種によってどちらの酵素を持つかは異なるが、大腸菌には両方の酵素 (HemF / HemN) が存在する。このため、好気的条件下でも生育することができる大腸菌が、進化の過程で酸素依存型のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを使用していた可能性は存在する。*hemG* 遺伝子の変異によって増殖が阻害されることから、プロトポルフィリノーゲン IX の酸化を通常行っている酵素は1つであることは明らかであるが、酸素依存型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする偽遺伝子が存在するとすれば、その復帰変異によって *hemG* 遺伝子を介さないプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性が現れると考えられる。

N13 は上記の 4) に該当し、*hemF* プロモーターの変異による発現量の上昇が原因であった。N11、N17 は 3)、4)、5) のいずれかであると考えられるが、N11、N17 由来のゲノムライブラリーから LG285 の増殖を回復させるクローンが得られなかったことから、3)

と 5) の可能性は低いと考えられる。

N13 の増殖回復に関与する遺伝子を同定する試みから、*hemF* が原因遺伝子であることがわかったが、*hemF* 遺伝子産物である酸素依存型コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼがプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性にも関係することは、以下の 3 つの実験結果から明らかになった。1) 野生型 *hemF* 遺伝子をクローン化した高コピープラスミド (*phemF*) を導入すると LG285 の増殖を回復させた (図 3-5)。2) N13 における *amiA-hemF* オペロンのプロモーター活性は、*amiA* 遺伝子の 5' 上流領域に起きた変異によって 3.7 倍に達していた (表 3-2)。3) *phemF* を導入した大腸菌の細胞破砕液中でのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性は、*hemG* を過剰発現した大腸菌の細胞破砕液と同レベルの値を示した。以上の結果から、酸素依存型コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼには、潜在的に弱いプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性が備わっていると考えられる。

プロトポルフィリノーゲン IX からプロトポルフィリン IX への変換は *in vitro* では酵素の触媒作用に依存せずに起こることから、復帰変異株の細胞内における自動酸化の可能性を考慮しなければならない。すなわち、*hemF* 遺伝子の過剰発現によって蓄積したプロトポルフィリノーゲン IX が自動酸化によってプロトポルフィリン IX に変換し、ヘム合成に利用されていることが考えられる。この場合、酸素非依存型コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする *hemN* 遺伝子を過剰発現することによっても同様の結果が期待されるが、クローン化した高コピープラスミドでは LG285 は相補されなかった (図 3-5)。また、*in vitro* ではプロトポルフィリノーゲン IX は自動酸化によってプロトポルフィリン IX に変換されるが、*hemF* 遺伝子を過剰発現した細胞破砕液中を加えた反応液ではプロトポルフィリン IX の生成が促進された (表 3-1)。これらの実験結果から、*hemF* 遺伝子の過剰発現による LG285 の相補は酸素依存型コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼによる酵素反応によるものであり、自動酸化による反応ではないということがわかる。

大腸菌の酸素依存型コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列は細菌 (Xu and Elliott, 1993; Hungerer *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1996)、酵母 (Zagorec *et al.*, 1988)、植物 (Madsen, *et al.*, 1993; Kruse, *et al.*, 1995)、動物 (Kohn *et al.*, 1993; Martasek *et al.*, 1994; Taketani *et al.*, 1994) のコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼと高い相同性を持っていることから、他の生物のコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼにもプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性が備わっていることが期待される。実際、竹谷ら (Taketani *et al.*, 1994) が単離したマウスのコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼをクローン化したプラスミドは LG285 を相補することが確認された。したがって、プロトポルフィリノーゲン IX を酸化する活性は、酸素依存型コプロポルフィリノーゲンに存在する普遍的な活性であることが予想される。Hansson ら (Hansson and Hederstedt, 1994; Hansson *et al.*, 1997) は枯草菌 *hemY* 遺伝子によってコードされるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼがコプロポルフィリノーゲン III も酸化することを報告した。異なるポルフィリン類が単一のタン

パク質によって認識されるという点では酸素依存型コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼの場合とよく似た現象であり、ヘム合成酵素の基質特異性を考える上でも興味深い。

コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする遺伝子の発現に関しては、酸素濃度に応答した転写調節が行われていることを示す実験結果が報告されている。酵母のコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする遺伝子である *HEM13* の転写は、*HAP1* や *ROX1* といった転写調節因子を介して低酸素濃度で活性化される (Keng, 1992; Zagorec *et al.*, 1988)。酵母のヘム合成においては、コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼとプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの2段階が分子状酸素を要求する反応であり、酸素濃度の影響を受ける。低酸素濃度ではコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼがヘム合成の律速段階であり (Labbe-Bois and Labbe, 1990; Pinkham and Keng, 1994)、*HEM13* の転写を活性化することによって細胞内の酵素の分子数を上昇させてこの段階の触媒機能を強化しているものと考えられる。大腸菌のコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼについては、転写調節因子 OxyR によって *hemF* 遺伝子の転写が活性化されることが報告されている

(Mukhopadhyay and Schellhorn, 1997)。OxyR は過酸化水素によって転写が活性化される遺伝子の調節因子として知られており、活性酸素の除去に働くカタラーゼをコードする *katG* などの酸素ストレスに対応するための多くの遺伝子の転写を活性化する (Tartaglia *et al.*, 1989)。OxyR が *hemF* 遺伝子の転写を活性化することには、カタラーゼなどの補欠分子団として必要なヘムの合成を促進する目的があると考えられる。一方、大腸菌には *hemN* 遺伝子がコードする酸素非依存型コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼが存在するため、コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼの発現調節は酵母の場合よりも複雑であると考えられる。*hemN* 遺伝子の発現については、嫌氣的条件で転写活性が上昇することが報告されている (Troup *et al.*, 1995)。本研究では、*lacZ* 融合遺伝子を用いた解析の結果、野生型遺伝子、変異型遺伝子ともに好氣的条件で *amiA-hemF* オペロンのプロモーター活性が上昇したが、好氣的条件で培養した際のプロモーター活性の上昇率は、N13 由来の変異型遺伝子の方が高かった (表 3-2)。この結果は、変異型遺伝子の転写には酸素濃度に応答する転写調節因子が関与していることを示唆するものである。

hemF 遺伝子産物はコプロポルフィリノーゲン III を酸化する際の電子受容体として酸素分子を要求するが (Dailey, 1990)、プロトポルフィリノーゲン IX を酸化する際にも同様に電子受容体として酸素を要求するのであろうか。N13 の増殖は嫌氣的条件では回復しなかった (図 3-1)。この原因として、1) *hemF* 遺伝子の発現量が嫌氣的条件で低下する；2) *hemF* 遺伝子産物による触媒作用に酸素が必要である；の2つの可能性を考え、検討した。大腸菌は酸素依存型と酸素非依存型の2種類のコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼを持ち、それぞれをコードする *hemF* / *hemN* 遺伝子の発現量も酸素濃度に依存して変化する。実際に N13 においても、*hemF* 遺伝子プロモーター活性は嫌氣的条件で低下した。しかし、野生型 *hemF* 遺伝子のコーディング領域を高コピープラスミドの *lacZ* プロモーターの

下流にクローン化し（*phemF*）、LG285 に導入したところ、好氣的条件では増殖が回復したのに対し嫌氣的条件では回復しなかった。このため、1) の可能性は排除され、*hemF* 遺伝子産物の触媒作用に酸素が必要であることがわかった。したがって、*hemF* 遺伝子産物によるプロトポルフィリノーゲン IX の酸化は、大腸菌 *hemG* 遺伝子産物による触媒作用とは異なり、真核生物や好気性細菌のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのように分子状酸素を反応の電子受容体として利用する反応機構であることが予想される。

分離した3つの復帰変異株のうち、*hemF* 遺伝子を欠失させることによって増殖が著しく阻害されたのは N13 のみで、N11 及び N17 は *hemF* 遺伝子を欠失しても液体培地中で 600 nm での吸光度が 0.6～0.7 程度まで増殖したため（図 3-6）、*hemF* 遺伝子に依存しないプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を有し、ヘム合成を行っていると考えられる。しかしこれらの復帰変異株の原因となっている遺伝子は現段階では同定できていない。変異形質が野生型の形質に対して劣勢であれば、変異遺伝子を LG285 に導入してもプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性は回復しないと考えられ、このような理由で N11 及び N17 由来のライブラリーからは LG285 の増殖を回復させるクローンが得られなかったものと考えられる。今後、トランスポゾンによりランダムに欠失変異を導入して増殖が悪くなった株を選択することによって、これらの株でプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性に関与している遺伝子を同定する試みが必要であろう。また、大腸菌細胞破碎液からプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を示す分画を精製し、アミノ酸配列を決定して遺伝子を同定することも可能であると考えられる。ポルフィリノーゲンをポルフィリンに酸化する活性に関しては、*in vitro* でペルオキシダーゼがこの活性を示すことが報告されており（Yamamoto *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1996）、細胞内でこのような活性によるポルフィリンの酸化がどのように抑制されているかを知る上でも、本研究で分離した復帰変異株を解析することは有効である。

第2節 シロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする cDNA の解析

大腸菌 *hemG* 遺伝子変異株を *in vivo* で相補するクローンを選択することによって、シロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードすると考えられる cDNA クローン λ gt11AGE17 を単離した。ライブラリーの各挿入断片は λ gt11 の *EcoRI* 部位に挿入されているため、 λ gt11AGE17 に挿入されていた 1.7 kb の断片中の *EcoRI* 部位がライブラリー作製時に装着された部位である可能性について検討した。この *EcoRI* 部位が cDNA 中に存在する部位であることは以下の 2 つの実験結果から確認した。(1) 1.7 kb の挿入断片を *EcoRI* で切断して pUC118 につないだサブライブラリーから得られた VSR800 を相補するクローンは、全て λ gt11AGE17 と同じ挿入断片を含んでいた。(2) 1.7 kb の挿入断片を *EcoRI* で切断して生じた 1.3 kb と 0.4 kb を別々にクローン化したプラスミドや λ gt11AGE17 と逆方向で 2 つの *EcoRI* 切断断片をつないだクローンは VSR800 を相補しなかった。さらに、この節の後半で触れる塩基配列及びアミノ酸配列の比較で、枯草菌や哺乳類のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼと全長にわたって相同性があったことから、 λ gt11AGE17 の挿入配列が他の cDNA とのキメラではないと判断した。

アシフルオルフェンは真核生物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを特異的に阻害する薬剤であり (Matringe *et al.*, 1989)、ジフェニルエーテル系の農薬として使用されている。大腸菌野生株の増殖はアシフルオルフェンによって阻害されなかったのに対し、 λ gt11AGE17 の挿入断片を pUC118 に再クローン化した pAGE17 を導入した VSR800 の増殖は、培地中に加えたアシフルオルフェンによって阻害された。このことから、pAGE17 による VSR800 の相補は真核生物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼによることが強く示唆された。

真核生物や好気性細菌のプロトポルフィリノーゲンは分子状酸素を電子受容体としてプロトポルフィリノーゲンの酸化を行うのに対し、嫌氣的に生育できる細菌のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは呼吸鎖の電子伝達系を電子受容体として用いる。このため、分子構造は大きく異なることが予想され、実際に精製された嫌気性細菌 *Desulfovibrio gigas* のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは 3 つのサブユニットからなっていることが報告されている (Klemm and Barton, 1987)。大腸菌は嫌气的条件でヘム合成を行うことから、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼも嫌気性細菌の酵素と同じ反応機構で働くことが予想される。従って、野生型大腸菌の増殖がアシフルオルフェンによって阻害されなかったのは、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの分子構造の違いによるものであると考えられる。

pAGE17 を導入した VSR800 の細胞破碎液中でのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性が、pUC118 を導入した VSR800 の活性の 20 倍に達したことから、pAGE17 が実際

にプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードしていることを確認した。VSR800の細胞破碎液でもわずかながらプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性を検出したが、これは第1節で示したコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼや、ペルオキシダーゼ (Yamato *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1996) による活性であると考えられる。

アシフルオルフェン等のジフェニルエーテル系の農薬がプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを阻害することは、トウモロコシ、ポテト (Matringe *et al.*, 1989)、キュウリ (Witkowski and Halling, 1989)、オオムギ (Jacobs *et al.*, 1991)、エンドウ (Matringe *et al.*, 1992)、レタス (Camadro *et al.*, 1994) において知られている。シロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性もアシフルオルフェンによって阻害され (図 3-14)、酵素活性を 50 % 阻害するのに必要なアシフルオルフェンの濃度: 800 nM は、トウモロコシの葉緑体とミトコンドリアで測定した値: 500 nM (Camadro *et al.*, 1991) とよく一致するものであった。

pAGE17 の挿入断片の塩基配列を決定した結果、この cDNA が 537 アミノ酸残基のタンパク質をコードする 1 つの連続した ORF からなることがわかった。推定されるアミノ酸配列のアミノ末端にはフラビンを含む酵素に共通して見られるグリシン残基配列:

GXGXXG (Brandsch *et al.*, 1987; Bach *et al.*, 1988; Ito *et al.*, 1988; Van Beeumen *et al.*, 1991; Lang *et al.*, 1991; Gari *et al.*, 1992) が存在していたことから、シロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼが補酵素としてフラビンを要求することが示唆された。この領域のアミノ酸残基は枯草菌、ヒト、マウスの間でもよく保存されており、酵素活性に関与している可能性が高い。

大腸菌のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列とは有効な相同性が認められなかったが、これは前述したような反応機構の違いを考慮すると当然である。

葉緑体はヘム及びクロロフィル合成に参与する全ての酵素を持っていることがわかっている (Fuesler *et al.*, 1984; Bhaya and Castelfranco, 1985)。これに対して植物のミトコンドリアでは PPOX とフェロケラターゼの活性は検出されているが (Porra and Lascelles, 1968; Little and Jones, 1976; Jacobs *et al.*, 1982)、プロトポルフィリノーゲン IX までの過程を触媒する酵素活性は検出されていない。さらに、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ、ポルフォビリノーゲンデアミナーゼ、コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼについては、葉緑体のみに局在することを示す実験結果も報告されている (Smith *et al.*, 1993)。一方、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性は植物細胞において葉緑体、ミトコンドリアの双方で検出されている (Jacobs *et al.*, 1982) のに加え、細胞膜にもプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性が存在するという報告もある (Jacobs and Jacobs, 1995)。これらの知見を総合すると、植物細胞内ではヘム及びクロロフィル合成の後半までは葉緑体で行われ、合成されたプロトポルフィリノーゲン IX の一部がミトコンドリア等のオルガネラに輸送されヘムの合成に用いられていると考えられる (図 4-1)。従って、植物には 2 種

類以上のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼがあると考えられてきたが、Lermontova ら（Lermontova *et al.*, 1997）は最近、タバコのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする 2 種類の cDNA を単離し、抗体を作製してそれぞれの酵素が葉緑体またはミトコンドリアの分画に局在することを示した。また、ポテトのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼについても 2 種類の cDNA が単離され、タバコの酵素との相同性から一方が葉緑体型、もう一方がミトコンドリア型であると推定された（Johnston *et al.*, 1998）。pAGE17 の塩基配列から推定されるシロイヌナズナプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼはこれらの葉緑体型の酵素と高い相同性を示したことから、葉緑体に局在する酵素であると推定した。これらの葉緑体型のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ末端には図 3-17 に示したように 50～70 アミノ酸残基からなる付属的配列があり、葉緑体へ輸送される際に認識されるリーダーペプチドであると考えられる。

pAGE17 の塩基配列から推定されるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの分子量は 57.7 kD であった。また、*in vitro* で合成したタンパク質は電気泳動の結果、約 58 kD と 55 kD の分子量であることがわかった。約 58 kD のタンパク質はシグナル配列を含んだ前駆体であり、約 55 kD のタンパク質がプロセッシングを受けた後の酵素タンパク質であると考え、アミノ酸配列から推定されるリーダーペプチドの長さとはよく一致する。また、精製した酵母のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼが 58 kD の前駆体として合成されたばかりに膜結合型の 55 kD の酵素タンパク質に変化することが報告されており（Camadro *et al.*, 1994）、この値とも非常によく合致する。

ノーザンハイブリダイゼーションの結果から、単離したプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの発現量は根、花芽の組織ではごく少ないのに対し、葉の組織では高いことがわかった。この結果からもこのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼが葉緑体に局在する酵素であることが強く示唆された。この酵素の正確な局在を確認するには、抗体を作製し、電子顕微鏡を用いて観察する実験や、シグナル配列とレポーター遺伝子と融合させた形質転換植物を作製する方法がもっとも有効であると考えられるが、このような実験を行う上でも今回単離した cDNA は有用であろう。

植物細胞内には葉緑体とミトコンドリア内で電子伝達系に働くチトクロムの他にも、カタラーゼ、チトクロム P450、ペルオキシダーゼなど多くのヘムタンパク質が細胞質に存在する。従って、ヘム合成中間体の輸送を考える上でもプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼはキーポイントとなる酵素である。また、プロトポルフィリン IX は光により励起され一重項酸素などの活性酸素種を発生することから、植物細胞内のプロトポルフィリン IX に対しては蓄積を抑制するような機構の存在が予想される。プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼはプロトポルフィリン IX の合成に直接関わるという点でも注目すべきである。今後、生育条件の違いや、他のヘム合成酵素の過剰発現によるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの発現量をノーザンブロッティングや形質転換植物を用いて調べる実験に

より、これらの問題に対する多くの知見が得られるものと考えられる。

また、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは光要求性除草剤の標的分子であり、薬学、農学分野においても重要視されているが、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする cDNA を用いて酵素を高発現させ、除草剤耐性となった植物体を作成することが可能であろう。さらに、除草剤耐性作物の育種を行う際にも有用である。この際には、大腸菌 *hemG* 遺伝子変異株にシロイヌナズナプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの cDNA クローンを導入し、除草剤を加えた培地中で生育可能となった変異株を分離することにより除草剤耐性遺伝子を得ることが期待できる。

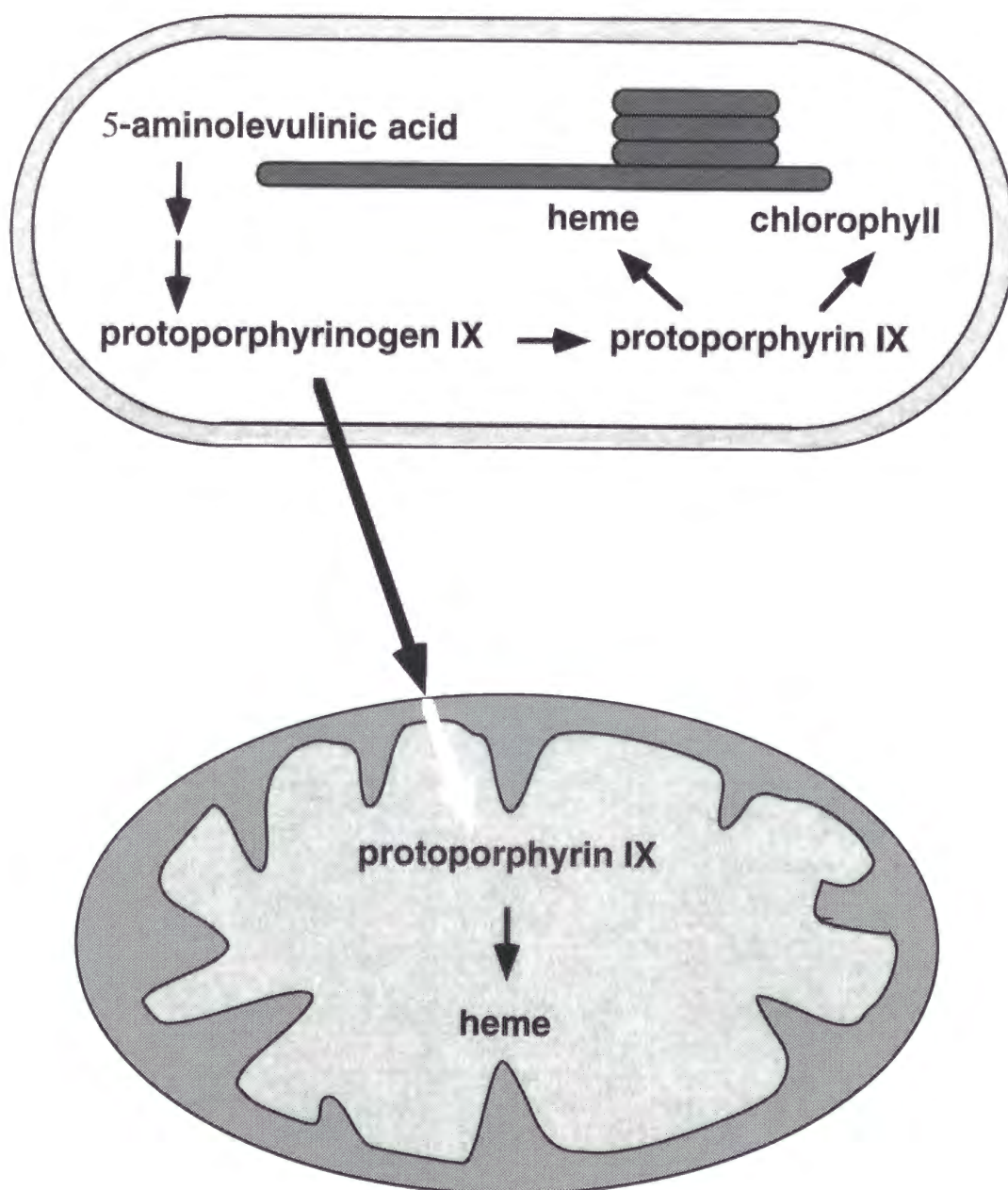


図4-1 植物細胞内でのヘム及びクロロフィル合成中間体の局在のモデル

ヘム及びクロロフィル合成中間体の植物細胞内における流れを示すモデルを模式的に表した。葉緑体において合成されたプロトポルフィリノーゲンが葉緑体内でプロトポルフィリンに酸化されるが、一部はミトコンドリアに輸送され、ミトコンドリアのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼによってプロトポルフィリンに酸化される。

第2節 大腸菌 *hemK* 遺伝子の機能

hemK 遺伝子欠失変異株である LK783 は、中屋敷ら (Nakayashiki *et al.*, 1995) が分離した *hemK* 遺伝子変異株 H103 と同様に、増殖が悪かった。*hemK* 遺伝子のみを含むプラスミドクローン (*phemK*) を導入することで LK783 の増殖が回復したことから (図 3-22)、*hemK* 遺伝子の欠失及びクロラムフェニコール耐性遺伝子の挿入による極性効果などではなく、*hemK* 遺伝子産物が合成されないことが原因であると考えた。

hemK 遺伝子変異株は元来、フェロケラターゼをコードする *hemH* 遺伝子の欠失株から、可視光抵抗性変異株として分離されたものである (Nakayashiki *et al.*, 1995)。フェロケラターゼを欠損する大腸菌変異株はプロトポルフィリン IX を細胞内に蓄積するため、可視光によって活性酸素種を発生して死にいたるが、*hemK* 遺伝子変異株では可視光の下でも増殖できた。このため、プロトポルフィリン IX の合成にいたるまでの段階に欠損があることが予想され、*hemK* 遺伝子はヘム合成に関与する酵素をコードする構造遺伝子であると考えられていた。LK783 においても細胞内にポルフィリン類の蓄積が認められたことから (図 3-23)、*hemK* 遺伝子変異がヘム合成経路に何らかの影響を及ぼすことが確認された。しかし、LK783 の増殖は培地中に加えた ALA やヘム酸化物によって回復しなかったことから、*hemK* がヘム合成に直接関与する遺伝子ではないことが明らかになった。さらに、表 3-5 に示したように、*hemK* 遺伝子欠失株では *hemA-prfA-hemK* オペロンのプロモーター活性が低下していることがわかった。このため、*hemA* 遺伝子の発現量が低下し、合成されるプロトポルフィリン IX の量が減少したことが *hemK* 遺伝子変異株の可視光抵抗性の原因であったと考えられる。

hemK 遺伝子欠失変異株からの復帰変異株を解析した結果、*prfB* 遺伝子に起きた変異により RF-2 のペプチド鎖解離活性が上昇していることがわかった (表 3-3)。本節では変異型 RF-2 が *hemK* 遺伝子欠失変異株の増殖を回復させる仕組みを検討することによって *hemK* 遺伝子の機能を推定する。

真正細菌は 2 種類のペプチド鎖解離因子 (RF-1、RF-2) を持ち、一般的に RF-1 が UAG コドンと UAA コドンを、RF-2 が UAA コドンと UGA コドンの終始コドンを認識しリボゾームの P 部位に結合した tRNA とペプチド鎖のカルボキシル末端の間のエステル結合を加水分解することによってペプチド鎖をリボゾームから解離するとされている (Caskey *et al.*, 1984b)。しかし実際は UAA コドンは RF-1 と RF-2 によって同等に認識されるのではなく、どちらか一方のペプチド鎖解離因子によって優先的に認識される。UAA コドンと RF-1、RF-2 との親和性は細菌種によって異なり、大腸菌では RF-1 が UAA コドンでのペプチド鎖の解離を行うのに対し、サルモネラ菌では RF-2 がこれを行う (Rydén and Isaksson, 1984; Kawakami *et al.*, 1988)。*hemK* 遺伝子欠失変異株から得られた 2 種の復帰変異株 (LLR201、HLR201) は *prfB* 遺伝子の同じ部位に変異が起きており、RF-2 の 246 残基目のスレオニン

がアラニンに置換していた。この 246 残基目のアミノ酸は大腸菌の RF-2 ではスレオニンであるのに対してサルモネラ菌ではアラニンであり、宇野ら (Uno *et al.*, 1996) はこの残基を置換することによって大腸菌 RF-2 の活性がサルモネラ菌の RF-2 の活性に近くなること、すなわち、UAA コドンにおけるペプチド鎖解離活性が上昇することを示した。LLR201 由来の RF-2 のペプチド鎖解離活性は UAA コドンと UGA コドンの両方で上昇していたが (表 3-3)、UGA コドンの認識は RF-2 の本来の機能であることから、UAA コドンの認識こそが変異型 RF-2 が獲得した形質であり、*hemK* 遺伝子変異株を相補するために必要な活性であると推察した。実際に、*hemK* 遺伝子欠失株では UAG コドンと UGA コドンでのペプチド鎖解離活性に影響がないのに対し、UAA コドンでのペプチド鎖解離活性は低下していた。したがって、変異型 RF-2 は *hemK* 遺伝子の欠失によって低下した UAA コドンでのペプチド鎖解離活性を相補することによって *hemK* 遺伝子欠失変異株の増殖を回復させていたと考えられる。

ここで、*hemK* 遺伝子を欠失することによって何故 UAA コドンでのペプチド鎖解離活性が低下したかについて考える。前述したように、大腸菌において UAA コドンは RF-1 によって認識されるため、*hemK* 遺伝子欠失変異によって RF-1 の機能が低下していることが予想される。RF-1 によるペプチド鎖解離反応は *in vitro* で再現が可能であり (Ganoza and Tomkins, 1970)、*hemK* 遺伝子産物がペプチド鎖解離反応に必要であるという報告はない。このため、*hemK* 遺伝子産物は RF-1 によるペプチド鎖解離活性に直接関与するというよりも、RF-1 の発現に影響を及ぼすと考えるのが妥当である。ここで RF-1 をコードする *prfA* 遺伝子が *hemK* 遺伝子とオペロンを形成していることを考慮すると、転写レベルでの相関に注目すべきである。*hemK* 遺伝子欠失株において *hemA-prfA-hemK* オペロンのプロモーター活性は、予想通り低下しており (表 3-5)、これが RF-1 のペプチド鎖解離活性が低下した直接の原因であると考えられる。これを支持する実験結果として、*lacZ* プロモーターにより *prfA* 遺伝子を発現させることによって *hemK* 遺伝子欠失変異株の増殖が回復した (図 3-29)。以上を総合すると *hemK* 遺伝子欠失変異株の増殖悪化は RF-1 による UAA コドンでのペプチド鎖解離活性が低下するため、*hemK* 遺伝子欠失変異株からの復帰変異株として *prfB* 遺伝子の変異株が得られた経緯は次のようであったと考えられる。1) *hemK* 遺伝子の欠失により *hemA-prfA-hemK* オペロンのプロモーター活性が低下した。2) *prfB* 遺伝子の発現量が低下した結果、RF-1 の分子数が減少し、RF-1 による UAA コドンの認識が悪化した。3) RF-2 の 246 残基目に起きた変異により UAA コドンの認識が改善した。

hemK 遺伝子の欠失により *prfA* 遺伝子の発現が低下したと考えられるが、UAG コドンでのペプチド鎖解離活性には影響がなかった (表 3-4)。この結果は UAA コドンに比べて UAG コドンに対する RF-1 の親和性が高く、分子数が減少しても十分なペプチド鎖解離活性を確保できることを示しているものと考えられる。変異型 RF-2 を導入することにより UAG コドンにおけるペプチド鎖解離活性が低下したことは、変異型 RF-2 が UAG コドン

とも相互作用していることを示すものであり、予想外の結果であった（表 3-3）。ただし、変異型 RF-2 を導入した後も UAG コドンにおけるペプチド鎖解離活性は十分に高く、この場合においても RF-1 と UAG コドンとの親和性が強いことがわかる。

ALA を加えることによって *hemK* 遺伝子欠失変異株の増殖が回復しなかったことから、*hemA* 遺伝子の発現量の低下は *hemK* 遺伝子欠失変異株における増殖悪化の原因ではないことがわかった。しかし、*hemK* 遺伝子変異株ではポルフィリン類の蓄積が認められた上に、前述したようにプロトポルフィリン IX の合成量が減少することが考えられることなど、ポルフィリン合成経路の酵素活性が低下していることが示唆された。これらの現象が *hemA* プロモーターの活性低下以外の原因によるものである可能性は完全に排除できないが、*hemK* 遺伝子産物が *hemA-prfA-hemK* オペロンの転写に影響を及ぼすことによってヘム合成とタンパク質合成の両方の活性を調節していると考えられる。

hemK 遺伝子 *prfA* 遺伝子内にある専用のプロモーターだけではなく、*hemA* プロモーターからも転写される（Elliott, 1989）。このため *hemK* 遺伝子産物を単なる転写促進因子とすると、*hemA* プロモーターからの転写活性は際限なく上昇してしまう。したがって、*hemK* 遺伝子産物が転写制御因子として働くためには、転写活性を調節する仕組みが必要とされる。Koonin ら（Koonin *et al.*, 1995）は *hemK* 遺伝子がコードするアミノ酸の配列に、多くのメチル基転移酵素に保存されている *S*-アデノシルメチオニン結合モチーフが存在すること（図 4-2）を報告しており、メチル化を介した転写調節機構の存在が示唆される。過去の実験結果から、*hemA* プロモーターからの転写活性は酸素濃度や ALA 濃度の影響を受けることが明らかになっており（Darie and Gunsalus, 1994; Choi *et al.*, 1996）、複数の転写因子の存在が予想されている。これらの転写因子の活性を制御する因子として *hemK* 遺伝子産物の機能を考えることは、*hemK* 遺伝子産物と *hemA-prfA-hemK* オペロンの転写活性との関係を説明するのに適している。

hemK 遺伝子のホモログが多くの細菌種に存在すること（図 1-3）を考慮すると、*hemK* 遺伝子産物を介した転写調節が他の細菌種においても行われていることが予想される。特に、*hemK* 遺伝子がしばしば *prfA* 遺伝子の近傍に存在すること（図 1-4）から、*prfA* 遺伝子の転写は *hemK* 遺伝子産物と最も関連の深い調節の対象であると考えられる。

大腸菌とサルモネラ菌において *hemK* 遺伝子が *prfA* 遺伝子だけではなく *hemA* 遺伝子ともオペロンを形成している（Elliott, 1989）ことは、ヘム合成とタンパク質合成の間に何らかの接点があることを示唆している。大腸菌においては、ヘム合成とタンパク質合成の接点がいくつか見つかっている。例えば、グルタミル tRNA はグルタミル tRNA 還元酵素とペプチジルトランスフェラーゼの共通の基質である（Jordan, 1990）。また、クロラムフェニコールやテトラサイクリンによってペプチジルトランスフェラーゼを阻害することによって大腸菌内でヘム合成が活性化されることが知られている（Nakayashiki *et al.*, 1995b）。*hemK* 遺伝子産物による *hemA-prfA-hemK* オペロンの転写調節機構を研究することにより、

ヘム合成とタンパク質合成の相互作用を明らかにすることができると考えられる。

consensus	UUDU\$\$\$.\$.....U..
Cfa	VLDIGCGWGGLAHYMAS
UbiG	VLDVGCGGGILAESMAR
PrmA	VIDFGCGSGILAIAALK
TrmA	LLELYCGNGNFSLALAR
EhB	TLDLGCGNGRNSLYLAA
Pcm	VLEIGTGSGYQTAILAH
SpeE	VLIIGGGDGAMLREVTR
Dcm	FIDLFAGIGGIRRGFES
HsdM	VQDPAAGTAGFLIEADR
KsgA	MVEIGPGLAALTEPVGE
CysG	VVLVGAGPGDAGLLTLK
HemK	ILDLTGTGTGAIALALAS

図 4-2 *hemK* 遺伝子産物の *S*-アデノシルメチオニン結合モチーフ

大腸菌メチル基転移酵素に存在する *S*-アデノシルメチオニン結合モチーフと *hemK* 遺伝子産物の 113～129 残基目のアミノ酸配列を比較した。多くの *S*-アデノシルメチオニン結合部位に保存されているアミノ酸残基を最上段に示した。U は高分子量疎水性残基を、\$ はグリシン、アラニン、セリンなどの低分子量残基を示す。（Koonin *et al.*, 1995 より抜粋）

謝辞

本研究は情報分子細胞学講座の担当教授である井口八郎先生のご指導の下、行ったものです。先生には研究生活の始めから丁寧にご指導いただき、研究者としての物事の考え方に至るまで、多くの事柄をお教えいただきました。

酵素活性の測定などの生化学的実験は、関西医科大学衛生学教室の竹谷茂先生に御指導をいただきました。また、種々の生物におけるポルフィリン生合成系の幅広い知識を与えて下さいましたことに深く感謝いたします。

京都大学大学院理学研究科植物応答機構解析学講座の岡田清孝教授、北海道大学低温科学研究所の田中亮一博士、カリフォルニア大学生物学科の伊藤寿朗博士には共同研究者としてハイブリダイゼーション用のメンブレンをお貸しいただくなど、植物の遺伝子に関する実験を中心に協力いただき、その他の実験でもご協力、ご助言をいただきました。

また、ゲノム情報分野（分子生物学講座）の諸先輩をはじめとする皆様には、実験の技術と、有用な議論と、研究においてもそれ以外においても楽しく過ごせる環境を与えていただきました。感謝いたします。

最後に、これまでの研究生活を物心両面において支えていただいた家族に感謝します。

参考文献

- Altman, S., S. Brenner, and J. D. Smith.** 1971. Identification of an ochre-suppressing anticodon. *J. Mol. Biol.* **56**: 195-197.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Meyers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. D. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.).** 1987. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y., USA.
- Bach, A. W. J., N. C. Lan, D. L. Johnson, C. W. Abell, M. E. Bembenek, S. W. Kwan, P. H. Seeburg, and J. C. Shih.** 1988. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 4934-4938.
- Bhaya, D. and P. A. Castelfranco.** 1985. Chlorophyll biosynthesis and assembly into chlorophyll-protein complexes in isolated developing chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 5370-5374.
- Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrik, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**: 1453-1462.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brandsch, R., A. E. Hinkkanen, L. Mauch, H. Nagursky, and K. Decker.** 1987. 6-Hydroxy-D-nicotine oxidase of *Arthrobacter oxidans*. Gene structure of the flavoenzyme and its relationship to 6-hydroxy-L-nicotine oxidase. *Eur. J. Biochem.* **167**: 315-320.
- Camadro, J. M., M. Matringe, R. Scalla, and P. Labbe.** 1991 Kinetic studies on protoporphyrinogen oxidase inhibition by diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* **277**: 17-21.

- Camadro, J. M., M. Matringe, N. Brouillet, F. Thome, and P. Labbe.** 1994. Characterization of plant and yeast protoporphyrinogen oxidase. In "Porphyrin pesticides" chemistry, toxicology, and pharmaceutical applications, chapter 6.
- Caskey, C. T., W. C. Forrester, W. Tate, and C. D. Ward.** 1984a. Cloning of the *Escherichia coli* release factor 2 gene. *J. Bacteriol.* **158**: 365-368.
- Caskey, C. T., W. C. Forrester, and W. Tate.** 1984b. Peptide chain termination, p. 457-466. In B. Clark and H. Petersen (ed.), Alfred Benzon Symposium, vol. 19. Munksgaard, Copenhagen, Denmark.
- Choi, P., L. Wang, C. D. Archer, T. Elliott.** 1996. Transcription of the glutamyl-tRNA reductase (*hemA*) gene in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: role of the *hemA* P1 promoter and the *arcA* gene product. *J. Bacteriol.* **178**: 638-646.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry III, F. Tekle, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. Mclean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M.-A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393**: 537-544.
- Cotter, P. A. and R. P. Gunsalus.** 1989. Oxygen, nitrate, and molybdenum regulation of *dmsABC* gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 3817-3823.
- Cox, R. and H. P. Charles.** 1973. Porphyrin-accumulating mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **113**: 122-132..
- Craig, W. J., R. G. Cook, W. P. Tate, and C. T. Caskey.** 1985. Bacterial peptide chain release factors: conserved primary structure and possible frameshift regulation of release factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 3616-3620.
- Dailey, H. A.** 1990. Conversion of coproporphyrinogen to protoheme in higher eukaryotes and bacteria: terminal three enzymes, p. 123-162. In H. A. Dailey (ed.), Biosynthesis of heme and chlorophylls. McGraw-Hill, New York, USA.

- Dailey, T. A., H. A. Dailey, P. Meissner, and A. R. K. Prasad.** 1995. Cloning, sequence, and expression of mouse protoporphyrinogen oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**: 379-384.
- Dailey, H. A. and T. A. Dailey.** 1996. Protoporphyrinogen oxidase of *Myxococcus xanthus*. Expression, purification, and characterization of the cloned enzyme. *J. Biol. Chem.* **271**: 8714-8718.
- Dailey, T. A. and H. A. Dailey.** 1996. Human protoporphyrinogen oxidase: expression, purification, and characterization of the cloned enzyme. *Protein Sci.* **5**: 98-105.
- Darje, S. and R. P. Gunsalus.** 1994. Effect of heme and oxygen availability on *hemA* gene expression in *Escherichia coli*: role of the *fnr*, *arcA*, and *himA* gene products. *J. Bacteriol.* **176**: 5270-5276.
- Deckert, G., P. V. Warren, T. Gaasterland, W. G. Young, A. L. Lenox, D. E. Graham, R. Overbeek, M. A. Snead, M. Keller, M. Aujay, R. Huber, R. A. Feldman, J. M. Short, G. J. Olsen, and R. V. Swanson.** 1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature.* **392**: 353-358.
- Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.
- Dragomirescu, T.** 1971. *Haemophilus influenzae*. *Microbiol. Parazitol. Epidemiol.* **16**: 109-119.
- Ellitoo, T.** 1989. Cloning, genetic characterization, and nucleotide sequence of the *hemA-prfA* operon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **171**: 3948-3960.
- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick, K. Mckenney, G. Sutton, W. FitzHugh, C. A. Fields, J. D. Gocayne, J. D. Scott, R. Shirley, L.-I. Liu, A. Glodek, J. M. Kelley, J. F. Weidman, C. A. Phillips, T. Spriggs, E. Hedblom, M. D. Cotton, T. R. Utterback, M. C. Hanna, D. T. Nguyen, D. M. Saudek, R. C. Brandon, L. D. Fine, J. L. Fritchman, J. L. Fuhrmann, N. S. M. Geoghagen, C. L. Gnehm, L. A. McDonald, K. V. Small, C. M. Fraser, H. O. Smith, and J. C. Venter.** 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* **269**: 496-512.

- Fraser, C. M., J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton, J. M. Kelley, J. L. Fritchman, J. F. Weidman, K. V. Small, M. Sandusky, J. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, D. M. Saudek, C. A. Phillips, J. M. Merrick, J.-F. Tomb, B. A. Dougherty, K. F. Bott, P.-C. Hu, T. S. Lucier. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*. **270**: 397-403.
- Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Watthey, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fujii, M. D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H. O. Smith, and J. C. Venter. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*. **390**: 580-586.
- Fraser, C. M., S. J. Norris, G. M. Weinstock, O. White, G. G. Sutton, R. Dodson, M. Gwinn, E. K. Hickey, R. Clayton, K. A. Ketchum, E. Sodergren, J. M. Hardham, M. P. McLeod, S. Salzberg, J. Peterson, H. Khalak, D. Richardson, J. K. Howell, M. Chidambaram, T. Utterback, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, M. D. Cotton, C. Fujii, S. Garland, B. Hatch, K. Horst, K. Roberts, M. Sandusky, J. Weidman, H. O. Smith, and J. C. Venter. 1998. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science*. **281**: 375-388.
- Frustaci, J. M. and M. R. O'Brian. 1993. The *Escherichia coli* *visA* gene encodes ferrochelatase, the final enzyme of the heme biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* **175**: 2154-2156.
- Fuesler, T. P., P. A. Caste, and Y. -S. Wong. 1984. Formation of Mg-containing chlorophyll precursors from protoporphyrin IX, δ -aminolevulinic acid, and glutamate in isolated, photosynthetically competent, developing chloroplasts. *Plant Physiol.* **74**: 928-933.
- Gari, E., J. C. Toledo, I. Gibert, and J. Barbe. 1992. Nucleotide sequence of the methoxyneurosporene dehydrogenase gene from *Rhodobacter sphaeroides*: comparison with other bacterial carotenoid dehydrogenases. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**: 103-108.
- Ganoza, M. C. and J. K. Tomkins. 1970. Polypeptide chain termination *in vitro*: competition for nonsense codons between a purified release factor and suppressor tRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**: 1455-1463.

- Gu, Y., and C. A. Genco.** 1997. Genbank accession no. U95845.
- Hansson, M. and L. Hederstedt.** 1992. Cloning and characterization on the *Bacillus subtilis* *hemEHY* gene cluster, which encodes protoheme IX biosynthetic enzymes. J. Bacteriol. **174**: 8081-8093.
- Hansson, M. and L. Hederstedt.** 1994. *Bacillus subtilis* HemY is a peripheral membrane protein essential for protoheme IX synthesis which can oxidize coproporphyrinogen III and protoporphyrinogen IX. J. Bacteriol. **176**: 5962-5970.
- Hansson, M., M. C. Gustafsson, C. G. Kannangara, and L. Hederstedt.** 1997. Isolated *Bacillus subtilis* HemY has coproporphyrinogen III to coproporphyrin III oxidase activity. Biocchim. Biophys. Acta **1340**: 97-104.
- Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkel, B. C. Li, and R. Herrmann.** 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. Nucleic Acids Res. **24**: 4420-4449.
- Hungerer, C., B. Troup, and D. Jahn.** 1995. Genbank accession no. X85015.
- Ikeda, H. and J. Tomizawa.** 1965. Transducing fragments in generalized transduction by phage P1. I. Molecular origin of the fragments. J. Mol. Biol. **14**: 85-109.
- Ito, A. and T. Ito.** 1988. Generation of singlet oxygen and oxy-radicals via Photosensitization Processes. Tanpakushitsu Kakusan Kohso. **33**: 2795-2802.
- Ito, A., T. Kuwahara, S. Inadome, and Y. Sagara.** 1988. Molecular cloning of a cDNA for rat liver monoamine oxidase B. Biochem. Biophys. Res. Commun. **157**: 970-976.
- Ito, T., H. Shiraishi, K. Okada, and Y. Shimura.** 1994. Two amidophosphoribosyltransferase genes of *Arabidopsis thaliana* expressed in different organs. Plant Mol. Biol. **26**: 529-533.
- Jacobs, J. M., N. N. Jacobs, and A. E. De Maggio.** 1982. Protoporphyrinogen oxidation in chloroplasts and plant mitochondria, a step in heme and chlorophyll synthesis. Arch. Biochem. Biophys. **218**: 233-239.
- Jacobs, N. J. and J. M. Jacobs.** 1982. Assay for enzymatic protoporphyrinogen oxidation, a late step in heme synthesis. Enzyme. **28**: 206-219.

- Jacobs, J. M. and N. J. Jacobs.** 1987. Oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin, a step in chlorophyll and haem biosynthesis. *Biochem. J.* **244**: 219-224.
- Jacobs, J. M., N. J. Jacobs, T. D. Sherman, and S. O. Duke.** 1991. Effect of diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin in organellar and plasma membrane enriched fraction of barley. *Plant Physiol.* **97**: 197-203.
- Jacobs, J. M. and N. J. Jacobs.** 1995. Terminal enzymes of heme biosynthesis in the plant plasma membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* **323**: 274-278.
- Jacobs, J. M., N. J. Jacobs, C. B. Kuhn, N. Gorman, F. E. Dayan, S. O. Duke, J. F. Sinclair, and P. R. Sinclair.** 1996. Oxidation of porphyrinogens by horseradish peroxidase and formation of a green pyrrole pigment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**: 195-199.
- Johnston, D. J., E. Droz, J. D. Rochaix, and P. Malno.** 1998. Cloning and characterization of potato cDNAs involved in tetrapyrrole biosynthesis: ferrochelatase (accession no. AJ005802), chloroplastic protoporphyrinogen IX oxidase (accession no. AJ005802), and mitochondrial protoporphyrinogen IX oxidase. *Plant Physiol.* **118**: 330-330.
- Jordan, P. M.** 1990. The biosynthesis of 5-aminolevulinic acid and its transformation into coproporphyrinogen in animals and bacteria, p. 55-122. *In* H. A. Dailey (ed.), *Biosynthesis of heme and chlorophylls*. McGraw-Hill, New York, USA.
- Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirose, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Hatsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda, and S. Tabata.** 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**: 109-136.
- Kawakami, K., T. Inada, and Y. Nakamura.** 1988. Conditionally lethal and recessive UGA-suppressor mutations in the *prfB* gene encoding peptide chain release factor 2 of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 5378-5381.
- Keng, T.** 1992. *HAP1* and *ROX1* form a regulatory pathway in the repression of *HEM13* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2616-2623.

- Klemm, D. J. and L. L. Barton.** 1987. Purification and properties of protoporphyrinogen oxidase from an anaerobic bacterium, *Desulfovibrio gigas*. J. Bacteriol. **169**: 5209-5215.
- Klenk, H.-P., R. A. Clayton, J.-F. Tomb, O. White, K. E. Nelson, K. A. Ketchum, R. J. Dodson, M. Gwinn, E. K. Hickey, J. D. Peterson, D. L. Richardson, A. R. Kerlavage, D. E. Graham, N. C. Kyrpides, R. D. Fleischmann, J. Quackenbush, N. H. Lee, G. G. Sutton, S. Gill, E. F. Kirkness, B. A. Dougherty, K. Mckenney, M. D. Adams, B. Loftus, S. Peterson, C. I. Reich, L. K. Mcneil, J. H. Badger, A. Glodek, L. Zhou, R. Overbeek, J. D. Gocayne, J. F. Weidman, L. McDonald, T. Utterback, M. D. Cotton, T. Spriggs, P. Artiach, B. P. Kaine, S. M. Sykes, P. W. Sadow, K. P. D'andrea, C. Bowman, C. Fujii, S. A. Garland, T. M. Mason, G. J. Olsen, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese, and J. C. Venter.** 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaen *Archaeoglobus fulgidus*. Nature. **390**: 364-370.
- Kohara, Y., K. Akiyama, and K. Isono.** 1987. The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting a large genomic library. Cell. **50**: 495-508.
- Kohno, H., T. Furukawa, Y. Yoshinaga, R. Tokunaga, and S. Taketani.** 1993. Coproporphyrinogen oxidase. Purification, molecular cloning, and induction of mRNA during erythroid differentiation. J. Biol. Chem. **268**: 21359-21363.
- Koonin, E. V., R. L. Tatusov, and K. E. Rudd.** 1995. Sequence similarity analysis of *Escherichia coli* proteins: Functional and evolutionary implications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**: 11921-11925.
- Kruse, E., H. P. Mock, and B. Grimm.** 1995. Coproporphyrinogen III oxidase from barley and tobacco - sequence analysis and initial expression studies. Planta. **196**: 796-803.
- Kushner, S. R., H. Nagaishi, A. Templin, and A. J. Clark.** 1971. Genetic recombination in *Escherichia coli*: the role of exonuclease I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **68**: 824-827.
- Labbe-Bois, R. and P. Labbe.** 1990. Tetrapyrrole and heme biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, p. 235-285. In H. A. Dailey (ed.), Biosynthesis of heme and chlorophylls. McGraw-Hill, New York, USA.

- Lang, H., M. Polster, and R. Brandsch.** 1991. Rat liver dimethylglycine dehydrogenase. Flavinylation of the enzyme in hepatocytes in primary culture and characterization of a cDNA clone. *Eur. J. Biochem.* **198**: 793-799.
- Lermontova, I., E. Kruse, H. -P. Mock, and B. Grimm.** 1997. Cloning and characterization of a plastidal and mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 8895-8900.
- Little, N. H. and O. T. G. Jones.** 1976. The subcellular localization and properties of the ferrochelatase of etiolated barley. *Biochem. J.* **156**: 309-314.
- Lovett, S. T. and R. D. Kolodner.** 1989. Identification and purification of a single-stranded-DNA-specific exonuclease encoded by the *recJ* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 2627-2631.
- Madsen, O., L. Sandal, N. N. Sandal, and K. A. Marcker.** 1993. A soybean coproporphyrinogen oxidase is highly expressed in root nodules. *Plant Mol. Biol.* **23**: 35-43.
- Martasek, P., J. M. Camadro, M. H. Delfau-Larue, J. B. Dumas, J. J. Montagne, H. de Varneuill, P. Labbe, and B. Grandchanp.** 1994. Molecular cloning, sequencing, and functional expression of a cDNA encoding human coproporphyrinogen oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 3024-3028.
- Matringe, M., J. M. Camadro, P. Labbe, and R. Scalla.** 1989. Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* **260**: 231-235.
- Matringe, M., J. M. Camadro, M. A. Block, J. Joyard, R. Scalla, P. Labbe, and R. Douce.** 1992. Localization within chloroplasts of protoporphyrinogen oxidase, the target enzyme for diphenyl ether-like herbicides. *J. Biol. Chem.* **267**: 4646-4651.
- Matsuyama, S. i., N. Yokota, and H. Tokuda.** 1997. A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **16**: 6947-6955.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.
- Miyamoto, K., K. Nakahigashi, K. Nishimura, and H. Inokuchi.** 1991. Isolation and characterization of visible light-sensitive mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **219**. 393-398.

- Mukhopadhyay, S., and H. E. Schellhorn.** 1997. Identification and characterization of hydrogen peroxide-sensitive mutants of *Escherichia coli*: genes that require OxyR for expression. *J. Bacteriol.* **179**: 330-338.
- Nakahigashi, K., K. Nishimura, K. Miyamoto, and H. Inokuchi.** 1991. Photosensitivity of a protoporphyrin-accumulating, light-sensitive mutant (*visA*) of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 10520-10524.
- Nakayashiki, T., K. Nishimura, and H. Inokuchi.** 1995a. Cloning and sequencing of a previously unidentified gene that is involved in the biosynthesis of heme in *Escherichia coli*. *Gene.* **153**: 67-70.
- Nakayashiki, T., K. Nishimura, R. Tanaka, and H. Inokuchi.** 1995b. Partial inhibition of protein synthesis accelerates the synthesis of porphyrin in heme-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **249**: 139-146.
- Nakayashiki, T. and H. Inokuchi.** 1997. Effects of starvation for heme on the synthesis of porphyrins in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **255**: 376-381.
- Nishimura, K., T. Nakayashiki, and H. Inokuchi.** 1995a. Cloning and identification of the *hemG* gene encoding protoporphyrinogen oxidase (PPO) of *Escherichia coli* K-12. *DNA Res.* **2**: 1-8.
- Nishimura, K., S. Taketani, and H. Inokuchi.** 1995b. Cloning of a human cDNA for protoporphyrinogen oxidase by complementation *in vivo* of a *hemG* mutant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**: 8076-8080.
- Nordman, Y. and J. -C. Deybach.** 1990. Human hereditary porphyrias, p. 491-542. *In* H. A. Dailey (ed.), *Biosynthesis of heme and chlorophylls*. McGraw-Hill, New York, USA.
- O'Neill, G. P. and Söll, D.** 1990. Transfer RNA and the formation of the heme and chlorophyll precursor, δ -aminolevulinic acid. *Biofactors.* **2**: 227-235.
- Peason, W. R. and D. J. Lipman.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 2444-2448.
- Pinkham, J. L. and T. Keng.** 1994. Heme-mediated gene regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. p. 455-501. *In* G. Winkelmann and D. R. Winge (ed.), *Metal ions in fungi*. Marcel Dekker, New York, USA.

Porra, R. J. and J. Lascelles. 1968. Studies on ferrochelatase. The enzymic formation of heme in proplastids, chloroplasts and plant mitochondria. *Biochem. J.* **108**: 343-348.

Poulson, R. 1976. The enzymic conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX in mammalian mitochondria. *J. Biol. Chem.* **251**: 3730-3733.

Presecan, E., I. Moszer, L. Boursier, H. C. Cruz Ramos, V. de la Fuente, M. F. Hullo, C. Lelong, S. Scheich, A. Sekowska, B. H. Song, G. Villani, F. Kunst, A. Danchin, and P. Glaser. 1997. The *Bacillus subtilis* genome from *gerBC* (311 degrees) to *licR* (334 degrees). *Microbiology.* **143**: 3313-3328.

Proulx, K. L. and H. A. Dailey. 1992. Characteristics of murine protoporphyrinogen oxidase. *Protein Sci.* **1**: 801-809.

Rebeiz, C. A., A. Montazer-Zouhoor, H. J. Hopen, and M. S. Mu. 1974. Photodynamic herbicides. *Enzyme Microb. Technol.* **6**: 390-401.

Rossi, E., S. Taketani, and P. Garcia Webb. 1993. Lead and the terminal mitochondrial enzymes of heme biosynthesis. *Biomed. Chromatogr.* **7**: 1-6.

Robison, K. 1994. Genbank accession no. U15186.

Russell, R. L., J. N. Abelson, A. Landy, M. L. Geftter, S. Brenner, and J. D. Smith. 1970. Duplicate genes for tyrosine transfer RNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **47**: 1-13.

Rydén, S. M. and L. A. Isaksson. 1984. A temperature-sensitive mutant of *Escherichia coli* that shows enhanced misreading of UAG/A and increased efficiency for some tRNA nonsense suppressors. *Mol. Gen. Genet.* **193**: 38-45.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., USA.

Sasarman, A., J. Letowski, G. Czaika, V. Ramirez, M. A. Nead, J. M. Jacobs, and R. Morais. 1993. Nucleotide sequence of the *hemG* gene involved in the protoporphyrinogen oxidase activity of *Escherichia coli* K12. *Can. J. Microbiol.* **39**: 1155-1161.

Short, J. M., J. M. Fernandez, J. A. Sorge, W. D. Huse. 1988. λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7583-7600.

- Siepkner, L. J., O. Marsh, and G. H. Elder.** 1987. Purification of bovine protoporphyrinogen oxidase: immunological cross-reactivity and structural relationship to ferrochelatase. *Biochim. Biophys. Acta.* **913**: 349-358.
- Smith, A. G., O. Marsh, and G. H. Elder.** 1993. Investigation of the subcellular location of the tetrapyrrole-biosynthesis enzyme coproporphyrinogen oxidase in higher plants. *Biochem. J.* **292**: 503-508.
- Smith, T. F. and M. S. Waterman.** 1981. Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* **147**: 195-197.
- Soll, L. and P. Berg.** 1974. Mutational alterations of tryptophan-specific transfer RNA that generate translation suppressors of the UAA and UAG and UGA nonsense codons. *J. Mol. Biol.* **86**: 233-243.
- Stephens, R. S., S. Kalman, C. Lammel, J. Fan, R. Marathe, L. Aravind, W. Mitchell, L. Olinger, R. L. Tatusov, Q. Zhao, E. V. Koonin, and R. W. Davis.** 1998. Genomic sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science.* **282**: 754-759.
- Takeshita, S., M. Sato, M. Toba, W. Masahashi, and T. Hashimoto-Gotoh.** 1987. High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ* α -complementation and chloramphenicol- or kanamycin- resistance selection. *Gene.* **61**: 63-74.
- Taketani, S., H. Kohno, T. Furukawa, T. Yoshinaga, and R. Tokunaga.** 1994. Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human coproporphyrinogen oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1183**: 547-549.
- Taketani, S., T. Yoshinaga, T. Furukawa, H. Kohno, R. Tokunaga, K. Nishimura, and H. Inokuchi.** 1995. Induction of terminal enzymes for heme biosynthesis during differentiation of mouse erythroleukemia cells. *Eur. J. Biochem.* **230**: 760-765.
- Tartaglia, L. A., G. Storz, and B. N. Aimes.** 1989. Identification and molecular analysis of OxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress. *J. Mol. Biol.* **210**: 709-719.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.

Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. **388**: 539-547.

Troup, B., M. Jahn, C. Hungerger, and D. Jahn. 1994. Isolation of the *hemF* operon containing the gene for the *Escherichia coli* aerobic coproporphyrinogen III oxidase by *in vivo* complementation of a yeast *HEM13* mutain. *J. Bacteriol.* **176**: 673-680.

Troup, B., C. Hungerger, and D. Jahn. 1995. Cloning and characterization of the *Escherichia coli hemN* gene encoding the oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase. *J. Bacteriol.* **177**: 3326-3331.

Uno, M., K. Ito, and Y. Nakamura. 1996. Functional specificity of amino acid at position 246 in the tRNA mimicry domain of bacterial release factor 2. *Biochimie*. **78**: 935-943.

Van Beeumen, J. J., H. Demol, B. Samyn, R. G. Bartsch, T. E. Meyer, M. M. Dolata, and M. A. Cusanovich. 1991. Covalent structure of the diheme cytochrome subunit and amino-terminal sequence of the flavoprotein subunit of flavocytochrome c from *Chromatium vinosum*. *J. Biol. Chem.* **266**: 12921-12931.

Weiss, R. B., J. P. Murphy, and J. H. Gallant. 1984. Genetic screen for cloned release factor genes. *J. Bacteriol.* **158**: 362-364.

Witkowski, D. A. and B. P. Halling. 1989. Inhibition of plant protoporphyrinogen oxidase by the herbicide acifluorfen-methyl. *Plant Physiol.* **90**: 1239-1242.

Woiseschlager, M. and G. Hogenauer. 1987. The *kdsA* gene coding for 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid 8-phosphate synthetase is part of an operon in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **207**: 369-373.

Wu, E.-D., H. Inokuchi, and H. Ozeki. 1990. Identification of the mutation in the *prfB* gene of *Escherichia coli* K-12, which confer UGA suppressor activity. *Jpn. J. Genet.* **65**: 115-119.

Xu, K. and T. Elliott. 1993. An oxygen-dependent coproporphyrinogen oxidase encoded by the *hemF* gene of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **175**: 4990-4999.

Yamato, S., T. Ida, M. Katagiri, and H. Ohkawa. 1995. A tobacco soluble protoporphyrinogen-oxidizing enzyme similar to plant peroxidases in their amino acid sequences and immunochemical reactivity. Biosci. Biotechnol. Biochem. **59**: 558-559.

Zagorec, M., J.-M. Buhler, I. Treich, T. Keng, L. Guarente, and R. Labbe-Bois. 1988. Isolation, sequence, and regulation by oxygen of yeast *HEM13* gene coding for coproporphyrinogen oxidase. J. Biol. Chem. **263**: 9718-9273.